

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Síntese e avaliação da atividade antitumoral de novas tiobenzanilidas

Maria João Álvaro Albuquerque Martins

**Mestrado em Química
Especialização em Química**

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Susana Santos
Professora Doutora Rita Pacheco

2017

Agradecimentos

Durante este último ano tive a oportunidade de beneficiar do contributo de muitas pessoas. Aqui eu gostaria de agradecer a todos.

Primeiramente gostaria de agradecer às minhas duas orientadores: Professora Doutora Susana Santos e à Professora Doutora Rita Pacheco, por toda a ajuda e por todos os conhecimentos que me foram transmitindo ao longo deste ano, sem elas este trabalho não era possível de ser realizado.

De seguida, gostaria de agradecer à Professora Doutora Filomena Martins pela ajuda prestada durante este ano.

Agradeço também à Engenheira Júlia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por ter realizado os espetros de RMN de temperatura variável, à Doutora Fernanda Marques do Campus Tecnológico Nuclear (CTN) por me ter disponibilizado as células A375. Ao Professor Doutor Victor Félix da Universidade de Aveiro por me ter executado o raio-X de monocristal. E à Doutora Conceição Oliveira do Centro de Química Estrutural no polo do Instituto Superior Técnico Rede Nacional de Espectrometria de Massa por ter realizado os ESI-HRMS dos meus compostos.

Agradeço à FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) por ter financiado os projetos UID/MULTI/00612/2013 e PTDC/QUI/67933/2006, nos quais esta tese está inserida.

Gostaria de agradecer também aos meus colegas de laboratório pelo espírito de amizade e de entreatajuda que se criou durante estes 12 meses, com um especial agradecimento à Catarina Oliveira por ser a minha “companheira das células” e à Joana Araújo. Sem esquecer todos os meus amigos a quem eu agradeço todo o apoio. Agradeço também ao Christophe por toda a dedicação e ajuda que me tem dado.

Por último gostaria de agradecer aos meus pais e aos meus irmãos todo o apoio que me têm dado ao longo dos anos.

Resumo

O cancro é uma das maiores causas de morte a nível mundial, sendo uma doença difícil de tratar e com taxas globais de cura ainda muito baixas. A quimioterapia é uma das principais armas para combater esta doença, mas, embora eficaz, é muito tóxica para as células saudáveis apresentando numerosos efeitos secundários. Ao longo dos anos a comunidade científica tem vindo a investir na descoberta e desenvolvimento de novos compostos menos tóxicos e mais seletivos para cada tipo de cancro, e que simultaneamente atuem nos cancros resistentes às terapêuticas atualmente existentes.

As tiobenzanilidas têm sido alvo de pesquisa neste campo pois, para além de apresentarem um leque vasto de aplicações biológicas incluindo atividades antifúngicas, antibacterianas e espasmolíticas, demonstram também possuir atividade anticancerígena em linhas celulares de melanoma maligno da pele e de cancro de mama hormono-dependente.

No âmbito desta tese sintetizaram-se cinco novos derivados da tiobenzanilida (**4.a-4.e**) e ressintetizaram-se quatro derivados já descritos anteriormente (**4.f**; **4.h**; **4.j** e **4.l**), e avaliou-se as respetivas atividades anticancerígenas (bem como a de outros compostos previamente sintetizados noutros trabalhos) em linhas celulares de cancro da mama hormono-dependente (MCF-7) e de melanoma maligno da pele (A375) usando o método colorimétrico do MTT. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados recorrendo às técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C /APT e técnicas bidimensionais), IV e por ESI-HRMS. Pela técnica de RMN verificou-se que em solução as tiobenzanilidas se encontram num equilíbrio entre os rotâmeros *trans* e *cis* sendo o rotâmero *trans* sempre o maioritário. O rácio entre estes dois rotâmeros parece depender da natureza da substituição da posição *orto* do anel benzoílico, pois quando se substituiu a posição 2 com um grupo NO_2 obteve-se um rácio de 1:0,6 mas quando se substituiu a mesma posição com um grupo CF_3 a proporção do rotâmero *cis* diminuiu significativamente surgindo numa proporção de 1:0,1, também se verificou que quando a posição 2 não estava substituída o equilíbrio entre os rotâmeros em solução não se formou. Para além deste factor, o equilíbrio entre os rotâmeros foi afectado pelas propriedades físico-químicas do solvente deuterado utilizado, tais como o número de doadores e aceitadores de hidrogénio (em CDCl_3 observa-se uma proporção do rotâmero *cis* maior do que quando se utiliza $\text{DMSO-}d_6$ ou $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$). Esta observação sugere que o rotâmero *trans* estabiliza por eventuais pontes de hidrogénio com os solventes que tenham grupos aceitadores de ligações de hidrogénio ou estabiliza na presença de solventes com momentos dipolares maiores, que é o caso do $\text{DMSO-}d_6$. Pela análise do espectro de difração de raio-X de monocristal do composto **4.a** constatou-se que no estado sólido estes compostos existem apenas na conformação *trans*.

Na linha celular A375 a maioria dos derivados da tiobenzanilida testados apresentaram valores de EC_{50} na ordem do μM , tendo-se verificado que a introdução de um substituinte na parte anilínica provocava, na maioria dos casos, um decréscimo dos EC_{50} quando comparados com o da tiobenzanilida não substituída nessa posição (**4.n**), para a qual se obteve um EC_{50} superior a $100 \mu\text{M}$ ao fim de 24h de incubação. Apenas os compostos **4.q** e **4.m** se mostraram menos citotóxicos do que o **4.n**. O composto mais promissor foi o **4.r** com um EC_{50} (24h) de $11,8 \mu\text{M}$, sendo este valor muito próximo do valor de EC_{50} determinado para a doxorubicina ($6,0 \mu\text{M}$), durante o mesmo tempo de incubação. A avaliação da citotoxicidade dos compostos sintetizados na linha celular MCF-7 está ainda em curso, tendo-se até ao momento apenas indicações preliminares da toxicidade dos compostos **4.c**, **4.f** e **4.q**. O composto **4.c** foi o que apresentou uma maior citotoxicidade, com um EC_{50} (24h) de $14,6 \mu\text{M}$, sendo este valor próximo do valor de EC_{50} determinado para o tamoxifen ($7,6 \mu\text{M}$).

Em conclusão, os resultados obtidos comprovam que as tiobenzanilidas têm atividade anticancerígena nas duas linhas celulares estudadas sendo uma família promissora para o desenvolvimento de compostos anticancerígenos.

A pequena biblioteca de compostos construída neste trabalho, que juntou compostos novos e compostos de trabalhos anteriores, e a avaliação da sua atividade anticancerígena, permitirá que muito em breve se possam fazer estudos de SAR e/ou QSAR, de modo a se poderem determinar as particularidades estruturais que poderão influenciar a atividade biológica.

Palavras-Chave: cancro, tiobenzanilidas, rotâmeros, citotoxicidade.

Abstract

Cancer is one of the major causes of death worldwide, being a difficult disease to treat and with overall cure rates still very low. Chemotherapy is one of the main weapons to combat this disease, but, despite its effectiveness, it is very toxic to healthy cells with numerous side effects. Over the years, the scientific community has been investing in the discovery and development of less toxic and more selective compounds for each cancer, that simultaneously could act on cancers resistant to traditional therapies.

Thiobenzanilides have been the subject of research in this field since, in addition to having a wide range of biological applications including antifungal activity, antibacterial activity and spasmolytic activity, they also showed anticancer activity in melanoma and hormone dependent breast cancer cell lines.

Within this thesis five novel thiobenzanilides derivatives (**4.a-4.e**) were synthesized and four derivatives (**4.f**; **4.h**; **4.j** e **4.l**) previously described were resynthesized, and their anticancer activity (together with that of other compounds previously synthesized in other works) were evaluated in hormone dependent breast cancer (MCF-7) and melanoma (A375) cell lines using the MTT assay.

All compounds were characterized by Nuclear Magnetic Resonance (^1H , ^{13}C /APT and two-dimensional techniques), FTIR and by ESI-HRMS techniques. By the NMR technique it could be seen that in solution thiobenzanilides are in equilibrium between the *trans/cis* rotamers being the *trans* rotamer always the major.

The ratio between the two rotamers seems to be dependent on the nature of the substituent on the 2 position of the benzoyl moiety, because when the position 2 was replaced with a NO_2 group, a ratio of 1:0.6 was obtained but when the same position was replaced with a CF_3 group the ratio of *cis* rotamer decreased at a ratio of 1:0.1. It was also found that when position 2 was not substituted the equilibrium between the rotamers in solution did not form. In addition to this factor, the equilibrium between the rotamers was affected by the nature of the deuterated solvent used, such as the number of hydrogen donor or acceptors (for example, in CDCl_3 there is a larger ratio of *cis* rotamer than when using $\text{DMSO}-d_6$ or $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$). This observation suggests that the *trans* rotamer is stabilized by possible hydrogen bonds with solvents having bond acceptor group or is stabilized by solvents with higher dipole moments, such as $\text{DMSO}-d_6$. By the analysis of the monocrystal X-ray of compound **4.a** it was found that in the solid state thiobenzanilides derivatives exist only in the *trans* conformation.

In the A375 cell line most of the tested thiobenzanilides derivatives showed EC_{50} values in the order of μM and it was found that the introduction of a substituent on the aniline moiety caused, in most cases, a decrease in EC_{50} values, when compared with thiobenzanilide not replaced in that position (**4.n**), for which an EC_{50} greater than $100\ \mu\text{M}$ was obtained at the end of 24h of incubation. Compounds **4.q** and **4.m** were the only ones less cytotoxic than **4.n**. Compound **4.r** was the most promising, with an EC_{50} (24h) of $11.8\ \mu\text{M}$, which is a value similar to the EC_{50} (24h) value of doxorubicin ($6.0\ \mu\text{M}$). The evaluation of the cytotoxicity of the synthesized compounds in the MCF-7 cell line is still ongoing, and so far there are only preliminar results for the toxicity of compounds **4.c**, **4.f** e **4.q**. Compound **4.c** showed the highest cytotoxicity, with an EC_{50} (24h) of $14.6\ \mu\text{M}$, which is a value very close to the EC_{50} (24h) value determined for tamoxifen ($7.6\ \mu\text{M}$).

In conclusion, the results obtained prove that the thiobenzanilides have anticancer activity in the two cell lines studied being a promising family for the development of anticancer compounds. The small library of compounds construed in this work, which combined new compounds and compounds from previous work, and the evaluation of their anticancer activity, will allow in a near future to carry out SAR and/ or QSAR studies, to determine the structural features that can influence the biological activity. **Key-words:** cancer, thiobenzanilides, rotamers, cytotoxicity.

Índice

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas.....	x
Índice de Esquemas	xii
Índice de Anexos	xiii
Abreviaturas e símbolos	xvii
• Símbolos.....	xvii
• Abreviaturas	xviii
1. Introdução.....	1
1.1. Cancro	1
1.1.1. Cancro da mama	2
1.1.2. Melanoma maligno da pele	4
1.2. Tiobenzanilidas: estrutura e atividade biológica	5
1.2.1. Tiobenzanilidas com atividade antibacteriana.....	7
1.2.2. Tiobenzanilidas com atividade espasmolítica	8
1.2.3. Tiobenzanilidas com propriedades antifúngicas.....	8
1.2.4. Tiobenzanilidas com atividade anticancerígena	9
Enquadramento do presente trabalho	11
2. Apresentação e discussão de resultados	12
2.1. Síntese de derivados da tiobenzanilida.....	12
2.1.1. Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida, 4.a.....	13
2.1.1.1. <i>N</i> -(4-benzilfenil)-2-nitrobenzoamida.....	13
2.1.1.2. <i>N</i> -(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida	16
2.1.2. Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-fenoxifenil)benzotioamida, 4.b	26
2.1.2.1. 2-Nitro- <i>N</i> -(4-fenoxifenil)benzoamida	26
2.1.2.2. 2-Nitro- <i>N</i> -(4-fenoxifenil)tiobenzoamida	28
2.1.3. Síntese e caracterização de 2-nitro- <i>N</i> -(4-octilfenil)benzotioamida, 4.c	32
2.1.3.1. 2-Nitro- <i>N</i> -(4-octilfenil)benzoamida	32
2.1.3.2. 2-Nitro- <i>N</i> -(4-octilfenil)benzotioamida	34
2.1.4. Síntese e caracterização de 2-nitro- <i>N</i> -(4-(octiloxi)fenil)benzotioamida, 4.d	39
2.1.4.1. 2-Nitro- <i>N</i> -(4-(octiloxi)fenil)benzoamida.....	39
2.1.4.2. 2-Nitro- <i>N</i> -(4-octiloxifenil)benzotioamida	41
2.1.5. Síntese e caracterização de 2-nitro- <i>N</i> -fenilbenzotioamida,4.e	47
2.1.5.1. 2-Nitro- <i>N</i> -fenilbenzoamida	47
2.1.5.2. 2-Nitro- <i>N</i> -fenilbenzotioamida	48

2.2.	Estudo do efeito do solvente no equilíbrio conformacional <i>trans/cis</i>	52
2.3.	Ensaio citotóxico em células tumorais	53
2.3.1.	Células do melanoma maligno da pele (A375)	54
2.3.2.	Células do cancro da mama hormono-dependente (MCF-7).....	59
3.	Materiais e Métodos	60
3.1.	Síntese	60
3.1.1.	Reagentes e Solventes	60
3.1.2.	Materiais e equipamentos	60
3.2.	Ensaio de citotoxicidade	61
3.3.	Síntese dos derivados de tiobenzanilida	61
3.3.1.	Procedimento geral para a síntese das benzanilidas 3.a-3.f e 3.l.....	61
3.3.1.1.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-benzilfenil)-2-nitrobenzamida, 3.a.....	62
3.3.1.2.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-fenoxifenil)benzamida, 3.b	63
3.3.1.3.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-octilfenil)benzamida, 3.c.....	63
3.3.1.4.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-(octiloxi)fenil)benzamida, 3.d.....	63
3.3.1.5.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -fenilbenzamida, 3.e.....	64
3.3.1.6.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-octilfenil)-2-(trifluorometil)benzamida, 3.f	64
3.3.1.7.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-fenoxifenil)benzamida, 3.l	64
3.3.2.	Procedimento geral para a síntese das tiobenzanilidas 4.a-4.f, 4.h, 4.j, 4.l	65
3.3.2.1.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida, 4.a.....	65
3.3.2.2.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-fenoxifenil)benzotioamida, 4.b	66
3.3.2.3.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-octilfenil)benzotioamida, 4.c	67
3.3.2.4.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -(4-(octiloxi)fenil)benzotioamida, 4.d	68
3.3.2.5.	Síntese e caracterização da 2-nitro- <i>N</i> -fenilbenzotioamida, 4.e	69
3.3.2.6.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-octilfenil)-2-(trifluorometil)benzotioamida, 4.f	70
3.3.2.7.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -fenil-2-(trifluorometil)benzotioamida, 4.h.....	71
3.3.2.8.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-fenoxifenil)benzotioamida, 4.j	71
3.3.3.0.	Síntese e caracterização da <i>N</i> -(4-octilfenil)benzotioamida, 4.l	72
3.4.	Cultura Celular	72
3.5.	Ensaio de viabilidade	72
4.	Conclusão	74
5.	Bibliografia.....	75
6.	Anexos.....	I

Índice de Figuras

Figura 1.1- Dados estatísticos sobre a incidência dos câncros mais comuns por género em 2012, adaptado de ⁷	1
Figura 1.2- Principais metabolitos do tamoxifen, adaptado de ¹⁶	3
Figura 1.3- Estrutura da doxorubicina.	5
Figura 1.4- Estrutura dos derivados da benzanilida (X=O) e tiobenzanilida (X=S); R e R' podem ser quaisquer substituintes orgânicos.	5
Figura 1.5- Formas de ressonância das amidas, adaptado de ³⁴	5
Figura 1.6-Conformação preferencial do grupo amida nas benzanilidas, adaptado de ²⁹	6
Figura 1.7- Equilíbrio conformacional das tiobenzanilidas.....	6
Figura 1.8- Estruturas dos compostos sintetizados por Jiri Kunes <i>et. al.</i> ⁵¹	7
Figura 1.9- Estruturas dos compostos sintetizados por Kozic <i>et. al</i> ⁴⁶	8
Figura 1.10- Estrutura de I.33 ⁴⁷	8
Figura 1.11- Estruturas dos compostos com maior atividade fungicida ⁵²	8
Figura 1.12- Tiobenzanilidas sintetizadas pelo grupo de Wan-Ping Hi, adaptado de ⁴⁸	9
Figura 1.13- Estruturas dos compostos mais promissores no cancro da mama hormono-dependente ¹⁴	10
Figura 1.14- Composto I.41, adaptado de ⁴⁹	10
Figura 1.15-Estrutura dos novos derivados de tiobenzanilida e respetiva numeração.	11
Figura 1.16- Tiobenzanilidas já sintetizadas no grupo de investigação onde este trabalho decorrerá. .	11
Figura 2.1- Estrutura e numeração do composto 3.a.	14
Figura 2.2- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 3.a.....	15
Figura 2.3- Ampliação do espetro de NOESY do composto 4.a em DMSO- <i>d</i> ₆ e estrutura numerada da conformação do composto 3.a. As setas a azul representam as correlações dos prótons como grupo NH observadas no NOESY.....	16
Figura 2.4- Estrutura e numeração do composto 4.a.	17
Figura 2.5- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC para o rotâmero <i>trans</i> do composto 4.a.....	19
Figura 2.6- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do rotâmero <i>cis</i> do composto 4.a.....	19
Figura 2.7- Cone de blindagem em RMN de tiobenzanilidas.	20
Figura 2.8- Ampliação do espetro de NOESY do composto 4.a (DMSO- <i>d</i> ₆ , 25°C).....	23
Figura 2.9- Equilíbrio entre os rotâmeros <i>trans</i> e <i>cis</i>	23
Figura 2.10- Ampliação dos espetros de ¹ H RMN com variação de temperatura do composto 4.a (DMSO- <i>d</i> ₆ , 25-115°C).	24
Figura 2.11- Ampliação dos espetros de ¹ H RMN com variação de temperatura do composto 4.a (DMSO- <i>d</i> ₆ , 115-25°C).	24
Figura 2.12- Representação ORTEP da estrutura do composto 4.a com o respetivo esquema de numeração atômica.	25
Figura 2.13- Estrutura numerada do composto 3.b.	26
Figura 2.14- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 3.b. ...	27
Figura 2.15- Estrutura numerada do composto 4.b.	28
Figura 2.16- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 4.b. ...	30
Figura 2.17- Estrutura numerada do composto 3.c.....	32
Figura 2.18- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 3.c.....	34
Figura 2.19- Estrutura numerada do composto 4.c.....	34

Figura 2.20- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC nos rotâmeros de 4.c.	37
Figura 2.21- Estrutura numerada do composto 3.d.	39
Figura 2.22- Principais correlações de COSY e HMBC do composto 3.d.	40
Figura 2.23- Estrutura numerada do composto 4.d.	41
Figura 2.24- Principais correlações detectadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 4.d.	44
Figura 2.25- Estrutura do composto numerado 3.e.	47
Figura 2.26- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 3.e.	48
Figura 2.27- Estrutura do composto numerado 4.e.	49
Figura 2.28- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC nos rotâmeros do composto 4.e.	50
Figura 2.29- Modificações estruturais das tiobenzanilidas e respectivos rácios <i>trans/ cis</i> em CDCl ₃ a 25°C.	52
Figura 2.30- Reação de conversão do MTT em formazan, adaptado de ⁶³ .	54
Figura 2.31- Microplaca dos ensaios da doxorubicina com diferentes concentrações (μM).	55
Figura 2.32- Fotografia da linha celular A375.	55
Figura 2.33- Comparação dos EC50 da família de compostos com 2-CF ₃ (4.f-4.h).	56
Figura 2.34- Comparação dos EC50 da família dos compostos com 2-NO ₂ (4.a-4.e).	57
Figura 2.35- Comparação dos EC50 da família dos compostos com 3,5-NO ₂ (4.o-4.s).	57
Figura 2.36- Comparação dos EC50 da família dos compostos sem substituinte na posição 2 (4.i-4.n).	58
Figura 2.37- Comparação das curvas dose-resposta do composto 4.r e da doxorubicina.	58

Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 3.a em CDCl_3 .	14
Tabela 2.2- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.a em CDCl_3 .	14
Tabela 2.3- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.a.	16
Tabela 2.4- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 4.a em CDCl_3 .	17
Tabela 2.5- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.a em CDCl_3 .	18
Tabela 2.6- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 4.a em $\text{DMSO}-d_6$.	21
Tabela 2.7- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.a em $\text{DMSO}-d_6$.	22
Tabela 2.8- Distâncias entre os átomos do composto 4.a segundo o raio-X	25
Tabela 2.9- Ângulos entre os átomos do composto 4.a segundo o raio-X	25
Tabela 2.10- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.a.	26
Tabela 2.11- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 3.b em CDCl_3 .	26
Tabela 2.12- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.b em CDCl_3 .	27
Tabela 2.13- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.b.	28
Tabela 2.14- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.b em CDCl_3 .	28
Tabela 2.15- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.b em CDCl_3 .	29
Tabela 2.16- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.b em $\text{DMSO}-d_6$.	30
Tabela 2.17- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.b em $\text{DMSO}-d_6$.	31
Tabela 2.18- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.b.	31
Tabela 2.19- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 3.c em CDCl_3 .	32
Tabela 2.20- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.c em CDCl_3 .	33
Tabela 2.21- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.c.	34
Tabela 2.22- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.c em CDCl_3 .	35
Tabela 2.23- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.c em CDCl_3 .	36
Tabela 2.24- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.c em $\text{DMSO}-d_6$.	37
Tabela 2.25- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.c em $\text{DMSO}-d_6$.	38
Tabela 2.26- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.c.	38
Tabela 2.27- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 3.d em CDCl_3 .	39
Tabela 2.28- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.d em CDCl_3 .	40
Tabela 2.29- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.d.	41
Tabela 2.30- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.d em CDCl_3 .	42
Tabela 2.31- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.d em CDCl_3 .	43
Tabela 2.32- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.d em $\text{DMSO}-d_6$.	45
Tabela 2.33- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.d em $\text{DMSO}-d_6$.	46
Tabela 2.34- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.d.	47
Tabela 2.35- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 3.e em CD_3OD .	47
Tabela 2.36- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.e em CD_3OD .	48
Tabela 2.37- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.e.	48
Tabela 2.38- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.e em CDCl_3 .	49
Tabela 2.39- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.e em CDCl_3 .	50
Tabela 2.40- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.e em $\text{DMSO}-d_6$.	51
Tabela 2.41- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.e em $\text{DMSO}-d_6$.	51
Tabela 2.42- Valores dos números de onda retirados do espectro de IV do composto 4.e.	52
Tabela 2.43- Rácio <i>trans/cis</i> do composto 4.a em vários solventes a 25°C.	53

Tabela 2.44- Valores de EC50 (μM) obtidos para os compostos 4.a-4.s e para a doxorrubicina para a linha celular A375, incubadas a 37 °C durante 24 horas; s- desvio à média e ER_{EC50} - erro relativo do EC50.....	55
Tabela 2.45- Valores de EC50 (μM) preliminares obtidos para os compostos 4.c; 4.f e 4.q e o para o tamoxifen para a linha celular MCF-7, incubadas a 37 °C durante 24 horas.	59
Tabela 3.1- Condições reacionais de síntese das benzanilidas 3.a-3.f e 3.l.....	62
Tabela 3.2- Condições reacionais de síntese das tiobenzanilidas 4.a-4.f, 4.h, 4.j-4.l.....	65

Índice de Esquemas

Esquema 2.1- Esquema reacional da síntese das tiobenzanilidas 4.a-4.e.....	12
Esquema 2.2- Mecanismo geral de síntese das benzanilidas.....	13
Esquema 2.3- Mecanismo geral de tionação usando LR.....	13

Índice de Anexos

Anexo 1- Espetro de RMN ^1H do composto 3.a, em CDCl_3 .	I
Anexo 2 - Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.a, em CDCl_3 .	I
Anexo 3- Espetro COSY do composto 3.a, em CDCl_3 .	II
Anexo 4- Espetro HSQC do composto 3.a, em CDCl_3 .	II
Anexo 5- Espetro HMBC do composto 3.a, em CDCl_3 .	III
Anexo 6- Espetro de IV do composto 3.a.	III
Anexo 7- Espetro de GC-MS do composto 4.a.	III
Anexo 8- Espetro de RMN ^1H do composto 4.a, em CDCl_3 .	IV
Anexo 9- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.a, em CDCl_3 .	IV
Anexo 10- Espetro COSY do composto 4.a, em CDCl_3 .	V
Anexo 11- Espetro HSQC do composto 4.a, em CDCl_3 .	V
Anexo 12- Espetro HMBC do composto 4.a, em CDCl_3 .	VI
Anexo 13- Espetro de RMN ^1H do composto 4.a, em $\text{DMSO}-d_6$.	VI
Anexo 14- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.a, em $\text{DMSO}-d_6$.	VII
Anexo 15- Espetro COSY do composto 4.a, em $\text{DMSO}-d_6$.	VII
Anexo 16- Espetro HSQC do composto 4.a, em $\text{DMSO}-d_6$.	VIII
Anexo 17- Espetro HMBC do composto 4.a, em $\text{DMSO}-d_6$.	VIII
Anexo 18- Espetro de IV do composto 4.a.	IX
Anexo 19- Espetro de HRMS do composto 4.a.	IX
Anexo 20- Espetro de RMN ^1H do composto 3.b, em CDCl_3 .	IX
Anexo 21- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.b, em CDCl_3 .	X
Anexo 22- Espetro COSY do composto 3.b, em CDCl_3 .	X
Anexo 23- Espetro HSQC do composto 3.b, em CDCl_3 .	XI
Anexo 24- Espetro HMBC do composto 3.b, em CDCl_3 .	XI
Anexo 25- Espetro de IV do composto 3.b.	XII
Anexo 26- Espetro de RMN ^1H do composto 4.b, em CDCl_3 .	XII
Anexo 27- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.b, em CDCl_3 .	XIII
Anexo 28- Espetro COSY do composto 4.b, em CDCl_3 .	XIII
Anexo 29- Espetro HSQC do composto 4.b, em CDCl_3 .	XIV
Anexo 30- Espetro HMBC do composto 4.b, em CDCl_3 .	XIV
Anexo 31- Espetro de RMN ^1H do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.	XV
Anexo 32- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.	XV
Anexo 33- Espetro COSY do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.	XVI
Anexo 34- Espetro HSQC do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.	XVI
Anexo 35- Espetro HMBC do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.	XVII
Anexo 36- Espetro de IV do composto 4.b.	XVII
Anexo 37- Espetro de HRMS do composto 4.b.	XVII
Anexo 38- Espetro de RMN ^1H do composto 3.c, em CDCl_3 .	XVIII
Anexo 39- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.c, em CDCl_3 .	XVIII
Anexo 40- Espetro COSY do composto 3.c, em CDCl_3 .	XIX
Anexo 41- Espetro HSQC do composto 3.c, em CDCl_3 .	XIX
Anexo 42- Espetro HMBC do composto 3.c, em CDCl_3 .	XX
Anexo 43- Espetro de IV do composto 3.c.	XX
Anexo 44- Espetro de RMN ^1H do composto 4.c, em CDCl_3 .	XXI
Anexo 45- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.c, em CDCl_3 .	XXI

Anexo 46- Espetro COSY do composto 4.c, em CDCl ₃ .	XXII
Anexo 47- Espetro HSQC do composto 4.c, em CDCl ₃ .	XXII
Anexo 48- Espetro HMBC do composto 4.c, em CDCl ₃ .	XXIII
Anexo 49- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXIII
Anexo 50- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXIV
Anexo 51- Espetro COSY do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXIV
Anexo 52- Espetro HSQC do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXV
Anexo 53- Espetro HMBC do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXV
Anexo 54- Espetro de IV do composto 4.c.	XXVI
Anexo 55- Espetro de HRMS do composto 4.c.	XXVI
Anexo 56- Espetro de RMN ¹ H do composto 3.d, em CDCl ₃ .	XXVI
Anexo 57- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 3.d, em CDCl ₃ .	XXVII
Anexo 58- Espetro COSY do composto 3.d, em CDCl ₃ .	XXVII
Anexo 59- Espetro HSQC do composto 3.d, em CDCl ₃ .	XXVIII
Anexo 60- Espetro HMBC do composto 3.d, em CDCl ₃ .	XXVIII
Anexo 61- Espetro de IV do composto 3.d.	XXIX
Anexo 62- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.d, em CDCl ₃ .	XXIX
Anexo 63- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.d, em CDCl ₃ .	XXX
Anexo 64- Espetro COSY do composto 4.d, em CDCl ₃ .	XXX
Anexo 65- Espetro HSQC do composto 4.d, em CDCl ₃ .	XXXI
Anexo 66- Espetro HMBC do composto 4.d, em CDCl ₃ .	XXXI
Anexo 67- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.d, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXXII
Anexo 68- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.d, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXXII
Anexo 69- Espetro COSY do composto 4.d, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXXIII
Anexo 70- Espetro HSQC do composto 4.d, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXXIII
Anexo 71- Espetro HMBC do composto 4.d, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XXXIV
Anexo 72- Espetro de IV do composto 4.d.	XXXIV
Anexo 73- Espetro de HRMS do composto 4.d.	XXXIV
Anexo 74- Espetro de RMN ¹ H do composto 3.e, em CD ₃ CD.	XXXV
Anexo 75- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 3.e, em CD ₃ CD.	XXXV
Anexo 76- Espetro COSY do composto 3.e, em CD ₃ CD.	XXXVI
Anexo 77- Espetro HSQC do composto 3.e, em CD ₃ CD.	XXXVI
Anexo 78- Espetro HMBC do composto 3.e, em CD ₃ CD.	XXXVII
Anexo 79- Espetro de IV do composto 3.e.	XXXVII
Anexo 80- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.e, em CDCl ₃ .	XXXVIII
Anexo 81- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.e, em CDCl ₃ .	XXXVIII
Anexo 82- Espetro COSY do composto 4.e, em CDCl ₃ .	XXXIX
Anexo 83- Espetro HSQC do composto 4.e, em CDCl ₃ .	XXXIX
Anexo 84- Espetro HMBC do composto 4.e, em CDCl ₃ .	XL
Anexo 85- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.e, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XL
Anexo 86- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.e, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XLI
Anexo 87- Espetro COSY do composto 4.e, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XLI
Anexo 88- Espetro HSQC do composto 4.e, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XLII
Anexo 89- Espetro HMBC do composto 4.e, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	XLII
Anexo 90- Espetro de IV do composto 4.e.	XLIII
Anexo 91- Espetro de HRMS do composto 4.e.	XLIII
Anexo 92- Espetro de RMN ¹ H do composto 3.f, em CDCl ₃ .	XLIII
Anexo 93- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 3.f, em CDCl ₃ .	XLIV

Anexo 94- Espetro COSY do composto 3.f, em CDCl ₃	XLIV
Anexo 95- Espetro HSQC do composto 3.f, em CDCl ₃	XLV
Anexo 96- Espetro HMBC do composto 3.f, em CDCl ₃	XLV
Anexo 97- Espetro de IV do composto 3.f.....	XLVI
Anexo 98- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.f, em CDCl ₃	XLVI
Anexo 99- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.f, em CDCl ₃	XLVII
Anexo 100- Espetro COSY do composto 4.f, em CDCl ₃	XLVII
Anexo 101- Espetro HSQC do composto 4.f, em CDCl ₃	XLVIII
Anexo 102- Espetro HMBC do composto 4.f, em CDCl ₃	XLVIII
Anexo 103- Espetro de IV do composto 4.f.....	XLIX
Anexo 104- Espetro de HRMS do composto 4.f.....	XLIX
Anexo 105- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.h, em CDCl ₃	XLIX
Anexo 106- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.h, em CDCl ₃	L
Anexo 107- Espetro COSY do composto 4.h, em CDCl ₃	L
Anexo 108- Espetro HSQC do composto 4.h, em CDCl ₃	LI
Anexo 109- Espetro HMBC do composto 4.h, em CDCl ₃	LI
Anexo 110- Espetro de IV do composto 4.h.....	LII
Anexo 111- Espetro de HRMS do composto 4.h.....	LII
Anexo 112- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.j, em CDCl ₃	LII
Anexo 113- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.j, em CDCl ₃	LIII
Anexo 114- Espetro COSY do composto 4.j, em CDCl ₃	LIII
Anexo 115- Espetro HSQC do composto 4.j, em CDCl ₃	LIV
Anexo 116- Espetro HMBC do composto 4.j, em CDCl ₃	LIV
Anexo 117- Espetro de IV do composto 4.j.....	LV
Anexo 118- Espetro de HRMS do composto 4.j.....	LV
Anexo 119- Espetro de RMN ¹ H do composto 3.l, em CDCl ₃	LV
Anexo 120- Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 3.l, em CDCl ₃	LVI
Anexo 121- Espetro COSY do composto 3.l, em CDCl ₃	LVI
Anexo 122- Espetro HSQC do composto 3.l, em CDCl ₃	LVII
Anexo 123- Espetro HMBC do composto 3.l, em CDCl ₃	LVII
Anexo 124- Espetro de IV do composto 3.l.....	LVIII
Anexo 125- Espetro de RMN ¹ H do composto 4.l, em CDCl ₃	LVIII
Anexo 126 - Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.l, em CDCl ₃	LIX
Anexo 127- Espetro COSY do composto 4.l, em CDCl ₃	LIX
Anexo 128- Espetro HSQC do composto 4.l, em CDCl ₃	LX
Anexo 129- Espetro HMBC do composto 4.l, em CDCl ₃	LX
Anexo 130- Espetro de IV do composto 4.l.....	LXI
Anexo 131- Espetro de HRMS do composto 4.l.....	LXI
Anexo 132- Sobreposição das ampliações na zona aromática dos espectros de ¹ H RMN dos compostos 4.b, 4.c, 4.e, 4.h, 4.f e 4.j. As setas a azul indicam alguns sinais do rotâmeros <i>cis</i> nos respectivos espectros.....	LXI
Anexo 133- Sobreposição das ampliações dos espectros em vários solventes do composto 4.a.....	LXII
Anexo 134- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.f-4.g da linha celular A375.	LXII
Anexo 135- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.a-4.e da linha celular A375.	LXII
Anexo 136- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.o-4.s da linha celular A375.	LXII
Anexo 137- Parte linear da curva dose-resposta do composto 4.q da linha celular A375.	LXII
Anexo 138- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.i-4.l da linha celular A375.	LXII
Anexo 139- Parte linear das curvas dose-resposta dos compostos 4.m-4.n da linha celular A375... ..	LXII

Anexo 140- Parte linear das curvas dose-resposta dos compostos 4.c, 4.f, 4.q e do tamoxifen da linha celular MCF7.....	LXIII
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------

Abreviaturas e símbolos

- **Símbolos**

Å – Angstrom

δ – Desvio químico

$\Delta\delta$ – Variação de desvio químico

° – Grau

g – Grama

Hz – Hertz

h – Horas

J – Constante de Acoplamento

m/z – Razão massa/carga

nm – Nanómetro

mL – Mililitro

μL – Microlitro

$\log []$ – Logaritmo de base 10 da concentração

M – Molar

mmol – Milimolar

μM – Micromolar

ν – Número de onda

TM – Marca Registrada

-I – Efeito Indutivo negativo

+M – Efeito mesomérico positivo

% – Percentagem

• Abreviaturas

1D – Unidimensional

2D – Bidimensional

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de próton

¹³C-APT – Carbon – ¹³ Attached Proton Test

A

APT – Attached Proton Test

ADN – Ácido desoxirribonucleico

C

c.c. – Cromatografia em coluna

c.c.f. – Cromatografia em camada fina

c.c.f.p. – Cromatografia em camada fina preparativa

CF₃ – Grupo trifluorometilo

CH – Carbono terciário

CH₂ – Carbono secundário

C – Carbono quaternário

COSY – Correlation Spectroscopy

CLog P – Logaritmo décimas do coeficiente de partição calculado

D

DCM – Diclorometano

d – Duplete

dd – Duplo duplete

DMEM – Meio de cultura celular (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

E

ESI-HRMS – Espectrometria de massa de alta resolução com ionização por Electrospray (do inglês “Electrospray Ionisation High-Resolution Mass Spectrometry”)

F

FBS – Soro fetal bovino (do inglês Fetal Bovine Serum)

H

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation

I

IV – Espetroscopia de Infravermelho (do inglês Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR))

L

LR – Reagente de Lawesson (do inglês “Lawesson's reagent”)

M

MeOH – Metanol

m – Multiplete

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (do inglês 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

MIC – Concentração inibitória mínima (do inglês Minimal inhibitory concentration)

N

NOESY – Nuclear Overhauser Spectroscopy

NADPH – Forma reduzida do fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADP)

NADH- Forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD)

NAD⁺ – Forma oxidada do NAD

P

PCD – Morte Celular Programada (do inglês “Programmed Cell Death”)

Ph – Fenilo (do inglês Phenyl)

py – Piridina (do inglês Pyridine)

ppm – Partes por milhão

P₄S₁₀ – Pentassulfureto de fósforo

PBS – Tampão de fosfato salina (do inglês “Phosphate-buffered saline”)

Q

quint – Quintuplete

QSAR – Relação quantitativa estrutura-atividade (do inglês quantitative structure-activity relationship)

R

RMN – Ressonância Magnética Nuclear (do inglês Nuclear Magnetic Resonance (NMR))

R_f – Factor de retenção

RP-18 C₁₈ – Sílica Gel de fase Reversa (do inglês “Reversed Phase Silica Gel”)

RX – Raio-X

S

s – Singuleto

SDS- Dodecil sulfato de sódio (do inglês sodium dodecyl sulfate)

T

t – Tripleto

td – Tripleto de dupletos

t.a. – Temperatura ambiente

U

UV-Vis – Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

1. Introdução

1.1. Cancro

O cancro é um termo genérico para um largo grupo de doenças onde há o crescimento descontrolado de células, as quais podem invadir partes adjacentes do corpo e/ ou espalhar-se para outros órgãos, através da corrente sanguínea, originando as metástases ¹ ou podem simplesmente crescer num determinado local do organismo, não invadindo outros tecidos ². Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro provocou em 2015 cerca de 8,8 milhões de mortes a nível mundial, correspondendo a cerca de 1 morte em cada 6 mortes ³. O cancro é incorporado no grupo de doenças não transmissíveis, assim como a diabetes, as doenças cardiovasculares e as doenças respiratórias e, deste grupo, o cancro é a segunda maior causa de morte ⁴. No ano de 2012 este tipo de doença provocou cerca de 38 milhões de mortes em todo o mundo ⁴.

O cancro é causado por alterações nos genes que controlam o crescimento e a divisão celular ². As alterações genéticas podem estar relacionadas com as mutações genéticas hereditárias e sistemas imunológicos debilitados ^{5,6} mas mais frequentemente, podem estar relacionadas com fatores como o crescimento e o envelhecimento da população mundial, bem como à prevalência dos fatores de risco, tais como a exposição de produtos carcinogénicos (presentes no tabaco, exposição prolongada a radiações como os raios ultravioleta do sol), sedentarismo, dietas desequilibradas, excesso de peso, entre outros ⁵. Estes fatores provocam um incremento acentuado do número de casos anuais de cancro ⁵.

Existem mais de 100 tipos diferentes de cancros, que podem ser divididos em duas classes: tumores sólidos, que são massas de tecidos, ou tumores líquidos, que geralmente não formam massas nos tecidos, como a leucemia ². Os tipos de cancro mais comuns no género masculino são os cancros do pulmão, próstata, estômago, fígado e região colorrectal, enquanto os tipos de cancro mais frequentes no género feminino são os cancros da mama, região colorrectal, pulmão, colo-uterino e estômago ². A Figura 1.1 apresenta os dados estatísticos sobre a incidência dos cancros mais comuns por género em 2012, segundo a OMS ⁷.


Género masculino			Género feminino	
Cancro do pulmão	16,8%		Cancro da mama	25,1%
Cancro da próstata	14,8%		Cancro colorrectal	9,2%
Cancro colorrectal	10,1%		Cancro do pulmão	8,8%
Cancro do estômago	8,5%		Cancro do colo-uterino	4,8%
Cancro do fígado	7,5%		Cancro do estômago	4,8%

Figura 1.1- Dados estatísticos sobre a incidência dos cancros mais comuns por género em 2012, adaptado de ⁷.

As células cancerígenas, sendo em geral menos diferenciadas do que as células normais altamente especializadas apresentam um crescimento rápido e descontrolado ², sendo ainda caracterizadas por terem baixas concentrações de oxigénio, baixo pH e por necessitarem de grandes quantidades de ferro (devido à sua rápida divisão), comparativamente às células normais ⁸.

A prevenção de muitos casos de cancro a nível mundial (entre 30-50%) pode ser feita modificando ou evitando fatores de risco-chave, tais como o consumo de produtos cancerígenos nomeadamente o tabaco e o álcool, havendo uma melhoria na dieta alimentar e na intensificação da prática de atividades físicas. Os cancros associados a infeções virais (vírus da hepatite B ou C, vírus do papiloma humano (HPV), entre outros) podem ser prevenidos com uma melhoria do sistema de vacinações e ou tratamento de infeções ^{3,6}.

A detecção precoce e um tratamento diferenciado adequado a cada tipo de cancro ajudam no aumento das taxas de sobrevivência, diminuindo o sofrimento a nível mundial. No entanto o tratamento torna-se mais difícil quando se diagnostica o cancro tardiamente, ou seja, quando já houve a proliferação das células cancerígenas⁹. Atualmente existem vários tratamentos para o cancro, porém os mais comuns são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Na maioria dos casos é necessário fazer um tratamento combinado com duas ou mais técnicas (como cirurgia e quimioterapia e /ou radioterapia) podendo, por vezes, recorrer-se apenas a uma abordagem. A cirurgia consiste na remoção do tecido afetado de forma total ou parcial, de acordo com o tipo de cancro e a zona onde se encontra alojado^{2,10}. Porém, nos casos em que o tumor originou metástases a cirurgia é normalmente combinada com outras terapias como a quimioterapia e radioterapia, pois esta apenas reduz o tamanho do tumor inicial. A radioterapia utiliza radiação ionizante (normalmente radiação raio-X) realizando a mesma função que a quimioterapia. Existem dois tipos de radioterapia: radioterapia externa e radioterapia interna. A radioterapia externa consiste na utilização de um aparelho (um acelerador linear de partículas) que bombardeia radiação de elevada energia numa determinada zona. A radiação interna consiste na ingestão ou injeção de fármacos radioativos que danificam o ADN das células cancerígenas^{2,10}. A quimioterapia consiste na utilização de fármacos anticancerígenos^{2,10}. No entanto na sua maioria, os fármacos disponíveis para a quimioterapia têm diversos efeitos secundários ou a taxa de sobrevivência é baixa e portanto hoje em dia há um grande esforço em encontrar terapias alternativas mais eficazes e com menos efeitos secundários².

1.1.1. Cancro da mama

O cancro da mama é um tipo de cancro onde há um crescimento descontrolado de células deste órgão, podendo começar em diferentes partes da mama. Este tipo de cancro é o mais comum entre as mulheres em todo o mundo, atingindo 25% dos casos totais de cancro na população feminina. Em Portugal são detetados cerca de 6000 novos casos de cancro de mama todos os anos havendo cerca de 1500 casos de morte¹¹. Embora o cancro da mama atinja maioritariamente as mulheres, este tipo de cancro também pode aparecer em homens, correspondente a 1% dos casos totais de cancro de mama que ocorrem em Portugal¹¹.

A maioria dos cancros da mama começam nos ductos que transportam leite para o mamilo (cancro ductal) ou nas glândulas do leite materno (cancro lobular), podendo existir outros tipos de cancro menos comuns².

Por norma, o cancro da mama é classificado em três grupos de acordo com a presença de recetores de estrogénio (RE), recetores de progesterona (RP) e fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2)¹². Assim, para efeitos de tratamento os cancros da mama são classificados em recetores positivos e negativos. O cancro que não afecte nenhuma das proteínas anteriores denomina-se triplo negativo.

Existem dois RE estruturalmente relacionados, o RE α e o RE β , originados em dois genes separados e diferencialmente expressos em tecidos. O RE α é responsável pela sinalização mitogénica induzida pelo estrogénio nas células epiteliais dos tecidos mamários, uterinos e dos ovários. Nas glândulas mamárias normais o 17 β -estradiol (E2) liga-se às duas isoformas dos RE controlando a proliferação e a diferenciação celular, existindo ambas as isoformas em concentrações baixas e equivalentes. Porém nas células cancerígenas, o RE α é produzido em maior quantidade que o RE β ^{13,14}. Os RE e RP têm sido utilizados desde 1970 como indicadores da capacidade de resposta endócrina e também como factor de prognóstico para a recorrência precoce deste cancro¹⁵. Na época, uma das maneiras utilizadas para fazer regredir o cancro da mama era fazer ooforectomias, hipofisectomias ou adrenalectomias com vista a reduzir a secreção de estrogénio. Atualmente os pacientes com RE e PR positivos são tratados recorrendo-se a um tratamento combinado com cirurgia

e terapia hormonal para inibir a sinalização nos RE. Cerca de 70% dos carcinomas que expressam o RE α podem ser tratados utilizando a terapia endócrina, sendo uma terapia de sucesso em cerca de 85% dos pacientes com cancro da mama RE α positivos^{2,13}. Esta terapia pode ser feita utilizando dois procedimentos. O primeiro consiste na utilização de antiestrogénios e o segundo baseia-se na utilização de inibidores da aromatase (enzima responsável pela biossíntese do estrogénio)¹³.

O fármaco mais utilizado no cancro da mama como modelador seletivo dos RE é o tamoxifen (nome comercial *Nolvadex*). Este composto foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1977 para o tratamento do cancro da mama num estágio já avançado e vários anos depois passou a ser administrado também a pacientes com cancro num estágio primário¹⁶. Existem dois isómeros do tamoxifen (*cis* e *trans*) no entanto o isómero *trans* é o que tem mais afinidade com os RE e como consequência é este que é administrado aos pacientes na forma de um sal de citrato¹⁶.

O mecanismo de ação deste fármaco no organismo consiste na sua própria interação e/ou dos seus metabolitos com os RE nos tecidos mamários ou não mamários. O tamoxifen sofre oxidação hepática pelas isoformas do citocromo P450 (CYP450) em vários metabolitos secundários. Os principais metabolitos são o *N*-desmetiltamoxifen (*N*-desmetilTAM) e o *trans*-4-hidroxitamoxifen (4-hidroxiTAM), Figura 1.2^{16,17}. O metabolito 4-hidroxiTAM tem cerca de 100 vezes mais afinidade para o RE α que o tamoxifen¹³.

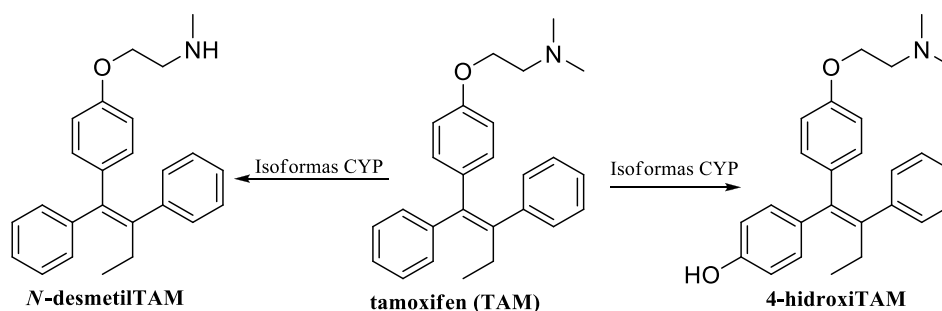


Figura 1.2- Principais metabolitos do tamoxifen, adaptado de¹⁶.

A terapia com o tamoxifen está associada a efeitos benéficos, como melhoria nos perfis lipídicos e aumento da densidade óssea em mulheres que estejam na pós-menopausa, no entanto os efeitos adversos à saúde humana também são muitos, tais como trombozes venosas raras, cancro do endométrio após um tratamento prolongado e afrontamentos^{14,18}. Para além disso os efeitos clínicos do tamoxifen em termos de eficiência e de toxicidade variam de indivíduo para indivíduo, havendo um aumento da resistência a este medicamento¹⁷. Os mecanismos de resistência ao tamoxifen podem estar relacionados com mecanismos farmacológicos, perda ou modificação na expressão RE (RE α e RE β), alterações nas proteínas co-reguladoras e regulação de diferentes vias de sinalização que participam no processo celular, tais como sobrevivência, proliferação, resposta ao *stress*, ciclo celular, entre outros^{19,20}. O mecanismo farmacológico de resistência ao tamoxifen está relacionado com a forma em que o fármaco é distribuído pelo organismo²¹. Alguns metabolitos do tamoxifen podem possuir atividade semelhante ao estrogénio podendo levar a um aceleração da resistência ao tamoxifen, enquanto outros possuem propriedades antiestrogénicas. A produção dos metabolitos com propriedades antiestrogénicas é dependente da produção de um enzima, variando a quantidade desse enzima de indivíduo para indivíduo; indivíduos em que a produção do enzima esteja diminuída apresentam um aumento da resistência ao fármaco²¹. Este problema de resistência juntamente com efeitos secundários advindos da toma do tamoxifen faz com que exista uma necessidade de investigar novas alternativas.

1.1.2. Melanoma maligno da pele

O melanoma maligno da pele é um tumor que tem origem na transformação maligna dos melanócitos (células produtoras de pigmentos) localizados na pele, epitélio de revestimento das mucosas, nevos melanócitos, melanócitos em vísceras e no olho ¹¹. Segundo a OMS ³, todos os anos existem cerca de 132000 novos casos de melanoma. Em Portugal, de acordo com os dados da Liga Portuguesa Contra o Cancro ¹¹ estima-se que anualmente surjam cerca de 700 novos casos.

O melanoma maligno da pele não é o tipo de cancro de pele mais comum mas é o mais mortífero ²² surgindo quando ocorrem danos no ADN, normalmente causado por radiação ultravioleta, desencadeando mutações ou defeitos genéticos que levam as células da pele a multiplicarem-se rapidamente. A maioria das células do melanoma produzem ainda melanina, pelo que os tumores apresentam uma cor preta ou castanha escura, no entanto alguns melanomas não produzem melanina aparecendo como lesões cor-de-rosa, vermelho, roxo, azul, branco ou até cor de pele ¹¹.

A doxorrubicina (*Adriamycin* nome comercial), Figura 1.3, que faz parte da família das antraciclina, é um fármaco muito usado no tratamento de tumores sólidos como cancro dos ovários, cancro do pulmão e melanoma maligno da pele, entre outros e de tumores do sangue e sistema linfático. A doxorrubicina apresenta grande eficiência na morte das células cancerígenas porém o surgimento de efeitos colaterais, como problemas cardíacos, aparecimento de novos cancros e o surgimento de resistência a este medicamento são limitações que travam o sucesso no tratamento dos cancros ^{23,24}. Para além disso, este fármaco não é específico para um tipo de cancro afectando o crescimento de células normais. Como consequência disto o sistema imunológico do paciente fica vulnerável ficando suscetível a infeções microbianas, fadiga e aumento do tempo de cicatrização. A gravidade destes efeitos adversos depende da dosagem da doxorrubicina ²⁵.

Atualmente, ainda não é conhecido o mecanismo de ação da doxorrubicina, mas existem várias propostas de mecanismos, incluindo inibição da topoisomerase II, formação de aductos com o ADN, *stress* oxidativo e entre outros ²⁴.

A topoisomerase II é um enzima que participa na replicação do ADN, estando sobreexpressa nas células cancerígenas de modo a que as células possam replicar rapidamente o seu ADN e por sua vez a divisão celular ser mais rápida. A doxorrubicina liga-se a este enzima provocando danos e rupturas no ADN levando à morte celular ^{26,27}.

Outro possível mecanismo de ação da doxorrubicina é a formação de aductos com o ADN, quando a doxorrubicina intercala o ADN, preferencialmente em regiões do ADN ricas em guanina e citosina, o que ativa os mecanismos de defesa da célula ativando a morte celular programada (PCD). Para além disso, a interação entre a doxorrubicina e o ADN pode ser estabilizada pela formação de uma ligação covalente mediada pelo formaldeído celular ²⁴. Os níveis detetados de formaldeído foram superiores em células cancerígenas sensíveis à doxorrubicina comparativamente com os valores detetados em células cancerígenas resistentes ou a células normais, assim, pensa-se que a formação de mais aductos provoca um aumento da eficiência da doxorrubicina. Estes aductos podem ser detetáveis quando a concentração de doxorrubicina é relativamente elevada, surgindo muitas vezes durante a quimioterapia ²⁴.

O mecanismo de *stress* oxidativo da doxorrubicina baseia-se na produção de radicais livres que vão destruir a membrana celular ²⁸, ou seja o grupo quinona presente na estrutura da doxorrubicina pode ser oxidada pelo enzima NADPH-oxidoreductase obtendo-se um radical de semiquinona. Estes radicais reagem rapidamente com o oxigénio, gerando superóxidos e peróxidos de hidrogénio sendo causadores dos danos no ADN ²⁴. Para além disso, a doxorrubicina é um quelante de ferro formando o complexo doxorrubicina-ferro, o qual converte o peróxido de hidrogénio em radicais hidroxilo altamente reativos. Desta forma os radicais livres libertados pela doxorrubicina podem originar *stress*

oxidativo provocando danos no ADN e noutros constituintes celulares e, consequentemente, levar à morte celular ²⁴.

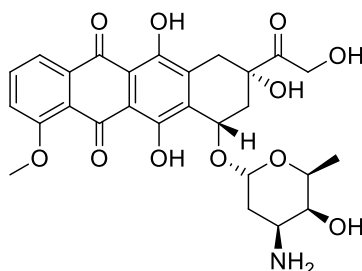


Figura 1.3- Estrutura da doxorubicina.

1.2. Tiobenzanilidas: estrutura e atividade biológica

Os derivados da benzanilida e da tiobenzanilida têm sido alvo de pesquisa por parte da comunidade científica pois apresentam um leque vasto de atividades biológicas. Em termos estruturais estas duas famílias são muito semelhantes, diferindo apenas no heteroátomo da ligação $C=X$, como representado na Figura 1.4.

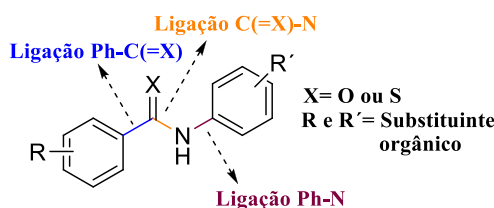


Figura 1.4- Estrutura dos derivados da benzanilida ($X=O$) e tiobenzanilida ($X=S$); R e R' podem ser quaisquer substituintes orgânicos.

Tanto nas benzanilidas como nas tiobenzanilidas, e de acordo com a substituição no azoto e/ou nos anéis aromáticos, podem surgir fenómenos estereoquímicos, devido à rotação da ligação simples $C(=X)-N$ e/ou à quiralidade axial da ligação $Ph-C(=X)/Ph-N$ ^{29,30}, se os dois arenos não estiverem no mesmo plano.

Nas amidas a ligação $C=O$ está muito polarizada ($C^{\delta+}=O^{\delta-}$) devido às diferenças de eletronegatividade entre o oxigénio e o carbono e como consequência, poderá haver uma deslocalização do par de eletrões desemparelhados do azoto para o carbono que está parcialmente carregado positivamente ³¹. Este carácter de dupla ligação parcial da ligação $C(=O)-N$ torna a ligação mais rígida, diminuindo a sua rotação livre e, possibilitando a existência e estabilização de rotâmeros *cis* e *trans* em relação à ligação amida ³².

A origem da barreira rotacional para as amidas e tioamidas não tem ainda uma explicação inequívoca, tendo sido atribuída a múltiplos fatores como interação entre os átomos da ligação amida ou tioamidas, redistribuições das cargas atômicas, variação no comprimento das ligações, etc ³⁷.

Segundo Wilberg and Rablen a barreira rotacional parece ser dependente da contribuição de cada uma das três formas de ressonância para a estrutura do composto ^{33,34}, Figura 1.5.

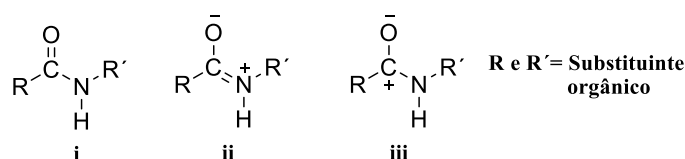


Figura 1.5- Formas de ressonância das amidas, adaptado de ³⁴.

Nas benzanilidas secundárias a conformação *trans* em torno da ligação C(=O)-N é a preferencial devido às repulsões estereoquímicas existentes entre o anel benzofílico e o anel anilínico enquanto as benzanilidas terciárias preferem geralmente a conformação *cis*, Figura 1.6 ^{29,35}. A conformação destes compostos é no entanto fortemente influenciada pela existência e natureza dos substituintes no átomo de azoto e na posição *orto* dos anéis aromáticos em relação ao grupo amida ^{36,37}.

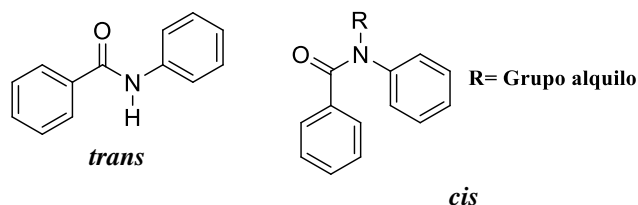


Figura 1.6-Conformação preferencial do grupo amida nas benzanilidas, adaptado de ²⁹.

No que concerne às tiobenzanilidas, o conhecimento estereoquímico ainda não foi totalmente explorado. No entanto uma vez que o enxofre possui uma eletronegatividade próxima à do carbono a ligação C=S não está tão polarizada como a ligação C=O ³¹ e portanto a estrutura de ressonância **iii** Figura 1.5 é irrelevante para as tioamidas, sendo consideradas apenas as estruturas **i** e **ii** da Figura 1.5 para este tipo de compostos. Assim, a doação π do azoto resulta num aumento da densidade electrónica entre o carbono e o enxofre. A transferência de carga do azoto para o enxofre é maior do que a do azoto para o oxigénio possivelmente devido à mudança do momento dipolar na rotação da ligação C(=S)-N e ao facto da rotação NR₂ (R- qualquer substituinte orgânico) nas tioamidas, que estão fora do plano, ser mais rígido, com o consequente aumento da barreira rotacional da ligação C(=S)-N comparativamente com a da ligação C(=O)-N ³³. O aumento da barreira rotacional nas tioamidas pode ser explicado pelo facto da ligação carbono-azoto (C-N) ser menor nas tioamidas do que nas amidas o que sugere que essa ligação é mais forte nas tioamidas, logo possui menos “flexibilidade” levando a um aumento da barreira rotacional entre as estruturas *cis* e *trans* ^{31,34}.

Os primeiros autores a descrever este fenómeno em tiobenzanilidas foram Walter e Kubersky, que procuraram estudar a relação entre o equilíbrio conformacional entre as formas *cis* e *trans* e a natureza e posição dos substituintes, não tendo no entanto chegado a uma explicação inequívoca ³⁸. A Figura 1.7 ilustra o equilíbrio conformacional dos dois rotâmeros.

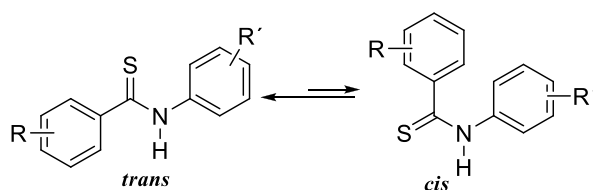


Figura 1.7- Equilíbrio conformacional das tiobenzanilidas.

Nas tiobenzanilidas secundárias, segundo a literatura, o rotâmero *trans* é o rotâmero maioritário ^{29,39,40}. Relativamente às tiobenzanilidas terciárias ainda não se existem estudos que relatem qual dos rotâmeros é o mais estável.

Os derivados da benzanilida têm demonstrado possuir um vasto leque de atividades biológicas, podendo atuar em desordens gastrointestinais ⁴¹, com espasmolíticas ^{41,42}, como antagonista α_1 -adrenoreceptor ⁴³ e também intervir na abertura dos canais de potássio ⁴⁴. Os derivados da tiobenzanilida também possuem um largo espectro de ação biológica ¹⁴ podendo atuar nos RE ¹⁴,

possuir atividades antifúngicas ⁴⁵, antibacteriana ⁴⁶, espasmolítica ⁴⁷, e uma importante atividade anticancerígena ^{48,49}.

1.2.1. Tiobenzanilidas com atividade antibacteriana

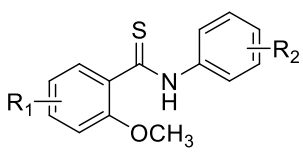
Um dos primeiros estudos sobre o potencial antibacteriano das tiobenzanilidas foi realizado pelos Waisser *et. al.* e publicado em 1990 ⁵⁰. Nesse trabalho foram sintetizadas 30 tiobenzanilidas fazendo diversas alterações estruturais em ambos os anéis benzênicos de modo a estudar o efeito dessas alterações sobre parâmetros moleculares como a lipofilicidade e parâmetros eletrônicos, e posteriormente relacioná-los com a atividade antibacteriana contra a *Mycobacterium kansasii*, bactéria causadora de algumas tuberculoses. Os autores constataram que a atividade antibacteriana estaria relacionada com as alterações estruturais de cada tiobenzanilida, sendo a atividade favorecida pela introdução de um grupo lipofílico na posição 4' do anel anilínico.

Como consequência dos resultados obtidos por Waisser *et. al.*, em 2002, Jiri Kunes *et. al.* ⁵¹ publicaram um estudo no qual reportaram a síntese de 14 derivados da tiobenzanilida, Figura 1.8, e a avaliação das respectivas atividades antibacterianas em algumas estirpes de bactérias diferentes, incluindo a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium avium*. Estes investigadores observaram que a substituição com grupos com características eletrônicas e de lipofilicidade diferentes na posição 3 do anel benzoílico não contribuíam favoravelmente para o aumento das atividades antibacterianas; pelo contrário a substituição da posição 4' do anel anilínico com substituintes como o isopropilo aumentava a atividade comparativamente à dos derivados que possuíam uma cadeia linear, como por exemplo o butilo.

Composto	Estrutura	
	R ₁	R ₂
I.1	H	CH(CH ₃) ₂
I.2	Cl	CH(CH ₃) ₂
I.3	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
I.4	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂
I.5	Br	CH(CH ₃) ₂
I.6	NO ₂	CH(CH ₃) ₂
I.7	H	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
I.8	Cl	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
I.9	CH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
I.10	OCH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
I.11	Br	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
I.12	NO ₂	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
I.13	H	C ₆ H ₁₂
I.14	Cl	C ₆ H ₁₂

Figura 1.8- Estruturas dos compostos sintetizados por Jiri Kunes *et. al.* ⁵¹.

Mais recentemente, em 2012 Kozic *et. al.* ⁴⁶, sintetizaram um conjunto de novos derivados da 2-metoxibenzotiamida com diversos substituintes nas posições 3 ou 4 do anel de benzoílico e um substituinte cloro na posição 4 ou 5 do anel anilínico, Figura 1.9. Posteriormente avaliaram as atividades antibacterianas dos compostos contra a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium avium*. O composto mais ativo contra a *Mycobacterium tuberculosis* foi o **I.19**, apresentando uma concentração de inibição de 2 µM/L.



Composto	R ₁	R ₂	Composto	R ₁	R ₂
I.15	4-Cl	3-NO ₂	I.24	5-Cl	3-NO ₂
I.16	4-Cl	4-NO ₂	I.25	5-Cl	4-NO ₂
I.17	4-Cl	3-Cl	I.26	5-Cl	3-Cl
I.18	4-Cl	4-Cl	I.27	5-Cl	4-Cl
I.19	4-Cl	3,4-Cl	I.28	5-Cl	3,4-diCl
I.20	4-Cl	3-Br	I.29	5-Cl	3-Br
I.21	4-Cl	4-Br	I.30	5-Cl	4-Br
I.22	4-Cl	3-CF ₃	I.31	5-Cl	3-CF ₃
I.23	4-Cl	4-CF ₃	I.32	5-Cl	4-CF ₃

Figura 1.9- Estruturas dos compostos sintetizados por Kozic *et. al*⁴⁶.

1.2.2. Tiobenzanilidas com atividade espasmolítica

Brunhofer *et. al.*⁴⁷ publicaram em 2011 um estudo que demonstrou que os derivados de tiobenzanilida também têm propriedades espasmolíticas. Neste trabalho de investigação, os autores compararam as atividades dos derivados da tiobenzanilida com os respectivos derivados da benzanilida e constataram que as tiobenzanilidas são mais ativas neste tipo de alvo. Utilizando a análise de Free-Wilson para os estudos de SAR observaram que o grupo piridilo na posição 3 do anel benzoílico tinha um efeito negativo na atividade espasmolítica. O composto mais ativo foi o 3,5-dinitro-*N*-(2,4,6-trifluorofenil)benzotioamida, **I.33** (Figura 1.10), cuja concentração de composto que inibiu 50% da resposta máxima foi 0,1 µM, demonstrando ser mais potente que a benzanilida correspondente que apresentou uma concentração de inibição de 50% da resposta máxima de 28 µM.

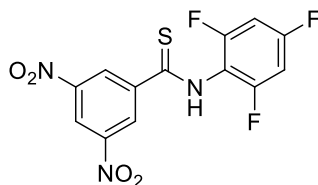


Figura 1.10- Estrutura de I.33⁴⁷.

1.2.3. Tiobenzanilidas com propriedades antifúngicas

Mattysiak *et. al.*⁵² em 2000 publicaram um estudo sobre a investigação do poder antifúngico de derivados de 2,4-dihidroxi-*N*-fenilbenzotioamida contra as espécies de fungos patogênicos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum* e *Trichosporon citaneum*. Os compostos que apresentaram atividades biológicas contra todos os fungos foram os que possuíam 2 átomos de cloro no anel anilínico, tanto nas posições 2 e 3 (*N*-(2,3-diclorofenil)-3,5-dihidroxibenzotioamida, **I.34**) como nas posições 3 e 4 (*N*-(3,4-diclorofenil)-3,5-dihidroxibenzotioamida, **I.35**), mantendo sempre a mesma substituição no anel benzoílico, Figura 1.11, apresentando valores de MIC entre 7,81 a 31,21 µg/mL dependendo da espécie.

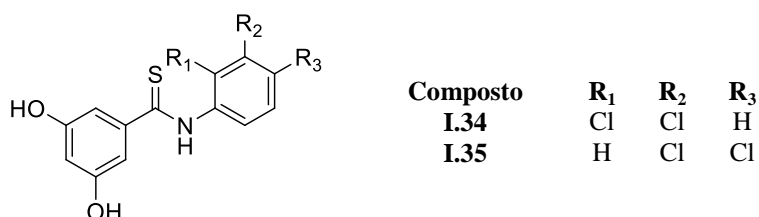


Figura 1.11- Estruturas dos compostos com maior atividade fungicida⁵².

1.2.4. Tiobenzanilidas com atividade anticancerígena

Como já foi descrito anteriormente as tiobenzanilidas têm um amplo espectro biológico, tendo também apresentado resultados promissores como compostos anticancerígenos. Wan-Ping Hu *et. al.* em 2008⁴⁸ foram os primeiros a avaliar a atividade anticancerígenas das tiobenzanilidas nas linhas celulares humanas A375 (melanoma maligno da pele), K562 (leucemia) e 293T (cancro dos rins). Estes investigadores estudaram também as atividades das respectivas benzanilidas tendo constatado que as tiobenzanilidas possuíam valores mais promissores. Os compostos sintetizados por este grupo possuíam diversos substituintes na posição 4 e na posição 4' possuíam sempre um grupo nitro, Figura 1.12.

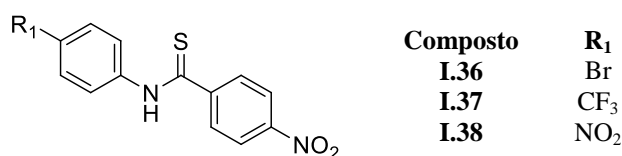


Figura 1.12- Tiobenzanilidas sintetizadas pelo grupo de Wan-Ping Hi, adaptado de⁴⁸.

Os compostos foram aplicados numa concentração de 10 µM em cada linha celular e ao fim de 24 horas a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTS (5- [3-(carboximetoxi)fenil] -3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio). Em todas as linhas celulares o composto **I.37** foi o que apresentou a taxa de sobrevivência mais baixa, sendo portanto mais citotóxico do que os restantes nestas linhas celulares.

Kucinska *et. al.*¹⁴ sintetizaram 27 benzanilidas e ditiobenzanilidas, substituídas em diversas posições em ambos os anéis aromáticos, com o intuito de determinarem a citotoxicidade dos compostos em três linhas celulares cancerígenas, cancro da mama hormono-dependente (MCF-7), adenocarcinoma do pulmão humano (A549) e adenocarcinoma da mama humano não hormono-dependente (MDA-MB-231) e em duas linhas celulares não cancerígenas (fibroblasto do pulmão CCD39Lu e células do epitélio da mama MCF-12A). Dos derivados de tiobenzanilida sintetizadas, dois apresentaram propriedades antiproliferativas seletivas contra células cancerígenas MCF-7 (Figura 1.13). O composto **I.40** apresentou-se como um candidato potencial para a terapia do cancro da mama hormono-dependente pois apresentou uma citotoxicidade elevada na linha celular do cancro da mama hormono-dependente, MCF-7 (EC50= 5,07 µM), contudo na linha celular do adenocarcinoma da mama humano não hormono-dependente, MDA-MB-231 (EC50> 100 µM), e nas células normais (EC50= 91,46 µM) apresentou valores de EC50 elevados, o que pode ser indicativo que é um composto seletivo para o cancro de mama hormono-dependente não afetando as células normais. Estudos de *Docking Molecular* realizados com este composto indicaram que o composto **I.40** interage com o RE na mesma região que o estradiol interagindo também com o aminoácido triptofano do recetor na posição 383 (W383).

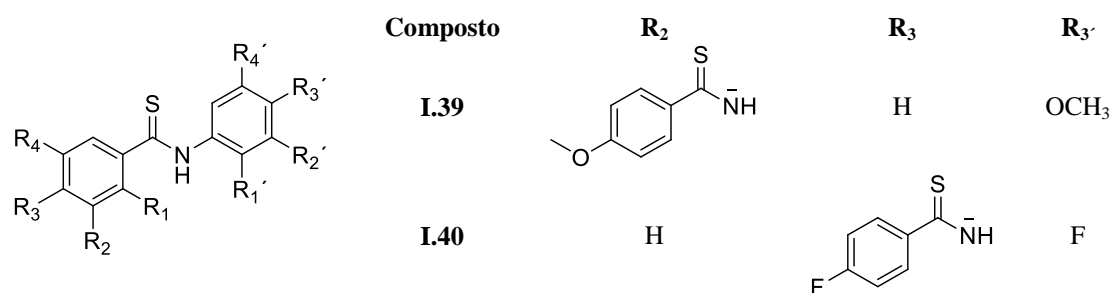


Figura 1.13- Estruturas dos compostos mais promissores no cancro da mama hormono-dependente ¹⁴.

Kucinska *et. al.* ⁴⁹ após os resultados obtidos no estudo anterior ¹⁴ selecionaram o composto *N,N'*-(1,2-fenileno)bis-3,4,5-trifluorobenzotiamida (**I.41**), dos 27 compostos já sintetizados, por ter apresentado o melhor valor de citotoxicidade na linha celular do adenocarcinoma do pulmão humano A549 (EC50= 0,41 µM) e um valor de EC50 maior nas células não cancerígenas do fibroblasto do pulmão, CCD39Lu (EC50= 1,11 µM), Figura 1.14.

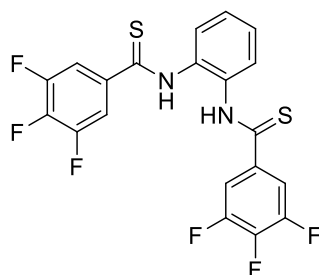


Figura 1.14- Composto I.41, adaptado de ⁴⁹.

Os resultados obtidos sugeriram que o composto **I.41** poderia ser considerado como um composto anticancerígeno seletivo, deste modo Kucinska *et. al.* desenvolveram várias experiências, tais como análise da morfologia celular, detecção de apoptose entre outras, para compreenderem o mecanismo subjacente à atividade anticancerígena deste composto.

Enquadramento do presente trabalho

Devido à existência de diversas enfermidades para as quais não existe tratamento e/ ou ao aparecimento de resistência a terapias já existentes para determinadas doenças, ou ainda à necessidade de criar medicamentos mais seguros, mais eficientes e menos tóxicos comparativamente aos medicamentos já existentes ⁵³, o desenvolvimento de novos compostos bioativos é uma área que continua em expansão. O cancro é, por excelência, a doença para a qual é imperativo encontrar novos medicamentos mais eficazes, mais seletivos e menos tóxicos.

Decorrente dos resultados promissores publicados sobre a atividade anticancerígena de tiobenzanilidas no combate a esta doença e no extenso trabalho que tem vindo a ser desenvolvido no grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido, de síntese de avaliação da atividade antitubercular de novas tiobenzanilidas, propôs-se para esta tese sintetizar novos derivados de tiobenzanilida e avaliar a sua atividade anticancerígena. Pretende-se sintetizar uma série de novas tiobenzanilidas secundárias com um substituinte nitro na posição 2 do grupo benzoílico e variando o grupo substituinte da posição 4' do anel anilínico, Figura 1.15-.

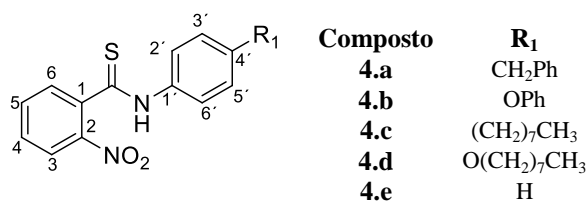


Figura 1.15-Estrutura dos novos derivados de tiobenzanilida e respetiva numeração.

As atividades anticancerígenas dos novos compostos sintetizados neste trabalho, serão avaliadas nas células do cancro da mama hormono-dependente (MCF-7) e do melanoma do maligno da pele (A375). Serão igualmente avaliadas nestas linhas celulares um conjunto de tiobenzanilidas sintetizadas em trabalhos anteriores, trabalhos de licenciatura e de mestrado, (Figura 1.16) de modo a ampliar o número de compostos e poder criar uma pequena biblioteca *in-house*, que possibilite a realização de um estudo preliminar de Relação Estrutura-Atividade (SAR). Esta ferramenta é fundamental para entender que grupo funcional é o responsável pelo efeito biológico no alvo no organismo ⁵⁴ e quais as modificações estruturais que poderão ser introduzidas para melhorar o desempenho dos compostos.

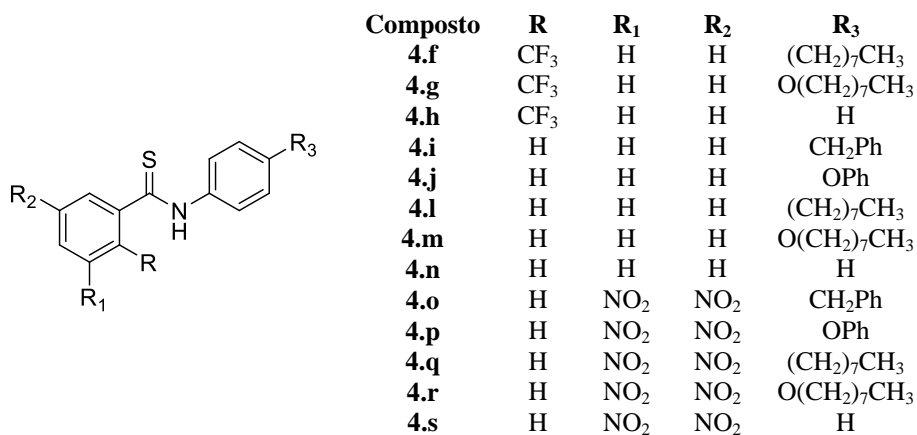


Figura 1.16- Tiobenzanilidas já sintetizadas no grupo de investigação onde este trabalho decorrerá.

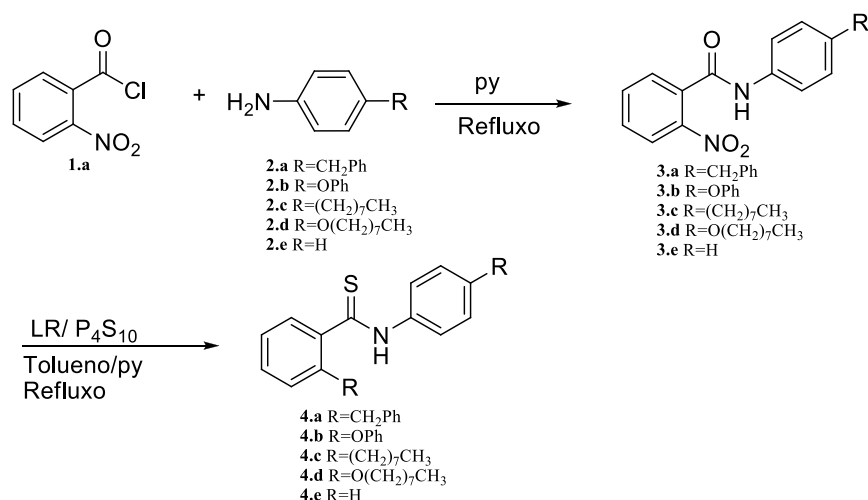
2. Apresentação e discussão de resultados

2.1. Síntese de derivados da tiobenzanilida

Como já foi referido o objetivo principal do presente trabalho foi criar uma pequena biblioteca de novas tiobenzanilidas e avaliar as suas atividades anticancerígenas nas linhas celulares do cancro da mama hormono-dependente (MCF-7) e do melanoma maligno da pele (A375).

Foram sintetizadas cinco novas tiobenzanilidas substituídas com um grupo nitro na posição 2 do grupo benzóico e diversos substituintes na posição 4' do anel anilínico. Foram igualmente resintetizadas algumas tiobenzanilidas já previamente estudadas no grupo de trabalho em que este projeto se inseriu, que diferiam das anteriores apenas no facto do substituinte da posição 2 benzóica ser um grupo trifluorometilo ou não haver substituição nessa posição. A avaliação posterior da atividade biológica deste conjunto de compostos poderá posteriormente permitir estabelecer uma correlação entre alterações estruturais específicas e a resposta biológica nos alvos em estudo.

As tiobenzanilidas (**4.a-4.e**) foram sintetizadas de acordo com as técnicas usuais em química orgânica e usando procedimentos gerais descritos na literatura ⁴⁸. Para este trabalho escolheu-se uma síntese em dois passos ¹, Esquema 2.1. No primeiro passo sintetizaram-se as benzanilidas intermediárias por reação de adição/eliminação entre as aminas e os cloretos de benzoílo escolhidos na presença de piridina ⁴². No segundo passo as benzanilidas são convertidas em tiobenzanilidas através de uma reação de tionação com o reagente de Lawesson (LR) ou como P₄S₁₀.

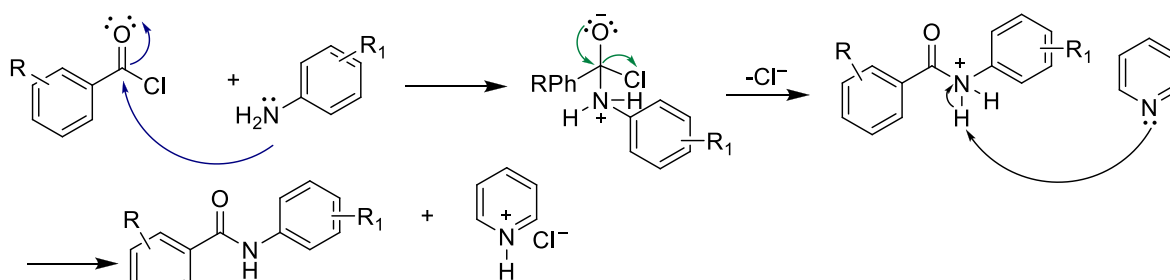


Esquema 2.1- Esquema reacional da síntese das tiobenzanilidas 4.a-4.e.

Do ponto de vista mecanístico o primeiro passo da síntese das tiobenzanilidas consiste numa reação de acilação do tipo Schotten-Baumann. Esta reação inicia-se por uma adição da amina ao grupo carbonilo ao cloreto de acilo, Esquema 2.2.

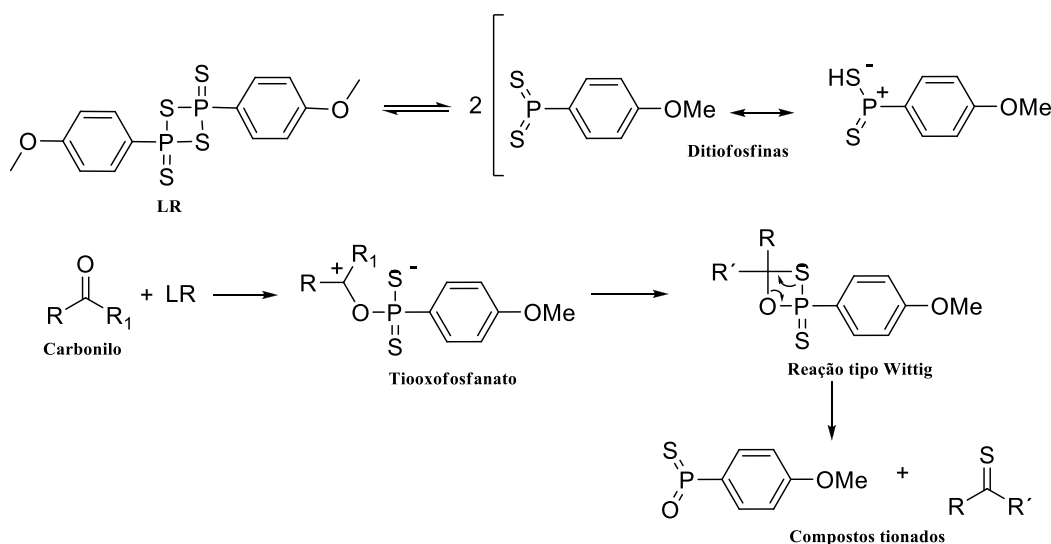
Posteriormente há a eliminação do ião cloreto e perda de um protão ligado ao azoto da amida. A abstração desse protão vai ser feita pela piridina, formando assim o cloreto de piridínio, uma vez que é uma base mais forte que o ião cloreto (pK_a de 5,2 e de -8 respetivamente) ⁵⁵⁻⁵⁷.

¹ - Para facilidade de representação na maioria das estruturas a ligação C(=S)-NH não têm a estereoquímica definida.



Esquema 2.2- Mecanismo geral de síntese das benzanilidas.

Neste trabalho para a tionação das benzanilidas escolheu-se o LR pois a sua utilização é muito vantajosa na medida em que as reações são obtidas com bons rendimentos, não são necessárias condições reacionais muito drásticas, o tempo de reação não é muito longo e não é necessário usar um grande excesso de LR ^{58,59}. O mecanismo reacional de tionação com o LR é apresentado no Esquema 2.3. Pensa-se que, em solução o LR se pode dissociar em duas moléculas de ditiofosfinas com as quais existem em equilíbrio. Estes intermediários altamente reativos podem reagir com os carbonilos dos compostos que se pretendem tionar formando tiooxofosfanatos, que posteriormente se decompõem, através de uma reação similar à de Wittig ⁵⁹, dando origem aos correspondentes compostos tionados.



Esquema 2.3- Mecanismo geral de tionação usando LR.

2.1.1. Síntese e caracterização da *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida, 4.a

2.1.1.1. *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzoamida

A síntese da *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida **4.a** foi realizada em dois passos, como referido anteriormente. No primeiro passo obteve-se a *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzamida **3.a** por reação entre o cloreto de 2-nitrobenzoílo **1.a** e a 4-benzilanilina **2.a**, de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.3.1.1. O composto **3.a** foi obtido com um rendimento de 39%. A Figura 2.1 representa a estrutura e numeração do composto **3.a** para efeitos de caracterização espectroscópica. A numeração utilizada seguiu as regras de precedência de grupos funcionais recomendados pela IUPAC ⁶⁰ e é igual para todos os compostos descritos neste trabalho.

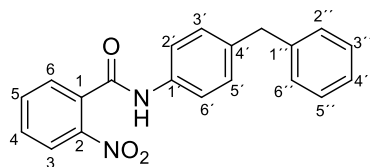


Figura 2.1- Estrutura e numeração do composto 3.a.

Todas as benzanilidas foram caracterizadas pelas técnicas espectroscópicas de RMN (^1H , ^{13}C -APT e técnicas bidimensionais COSY, HSQC, HMBC) e IV.

A atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 2.1 e Tabela 2.2) foi feita recorrendo às experiências ^{13}C -APT (que permite distinguir os diferentes tipos de carbonos ou seja os carbonos quaternários e os CH_2 estão na mesma fase do solvente e os CH e os CH_3 estão na fase oposta do solvente) e às correlações homonucleares COSY (^1H - ^1H) e heteronucleares HSQC (^1H - ^{13}C , correlação direta) e HMBC (^1H - ^{13}C , correlação a duas e três ligações). Os espectros de RMN podem ser observados nos Anexo 1 a Anexo 5.

Tabela 2.1- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 3.a em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
8,13	Dupleto	8,2	1H	7,62	H3
7,73	Tripleto	7,0	1H	7,64; 7,62	H5
7,64	Multipleteo	-	1H	7,73	H6
7,62			1H	8,13	H4
7,52	Dupleto	8,3	2H	7,21	H2'-H6'
7,42	Singuleto	-	-	-	NH
7,30	Tripleto	7,3	2H	3,98	H3''-H5''
7,21	Multipleteo	-	5H	3,98	H3'-H5'
7,20					H4''
7,19					H2''-H6''
3,98	Singuleto	-	2H	-	CH_2

Tabela 2.2- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.a em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
164,74	C	-	7,64	C=O
146,40	C	-	7,64	C2
141,03	C	-	7,30; 3,98	C1''
138,25	C	-	7,52; 3,98	C4'
135,25	C	-	7,52	C1'
133,93	CH	7,73	8,13	C5
133,07	C	-	7,73	C1
130,80	CH	7,62	7,64	C4
129,67	CH	7,21	3,98	C3'-C5'
128,86	CH	7,19	7,20	C2''-C6''
128,58	CH	7,30	3,98	C3''-C5''
128,50	CH	7,64	7,62	C6
126,15	CH	7,20	7,20	C4''
124,77	CH	8,13	7,73	C3
120,61	CH	7,52	7,52	C2'-C6'
41,36	CH_2	3,98	7,21	CH_2

A análise dos espectros permitiu identificar todos os prótons e carbonos pertencentes ao composto **3.a**. No espectro de ^1H RMN os prótons do anel benzílico *orto* dissustituído constituem, como esperado um sistema ABMX. O desdobramento dos sinais e as correlações no espectro COSY entre os sinais a δ 8,13 ppm, 7,73 ppm, 7,64 ppm e 7,62 ppm, todos integrando apenas um próton, confirmam o acoplamento adjacente entre estes prótons. O duplete a 8,13 ppm foi atribuído a H3 devido ao seu desvio químico elevado, indicativo da vizinhança de um grupo fortemente desblindante. O sinal a δ 7,64 ppm integrado num multipeto, foi atribuído a H6 devido à correlação observada com o carbono do grupo C=O (164,74 ppm), uma vez que é o único próton aromático suscetível de apresentar essa correlação. O tripleto a 7,73 ppm foi atribuído a H5 com base na sua correlação HMBC entre o carbono quaternário a δ 133,0 ppm atribuído a C1 devido ao seu desvio químico. O sinal a δ 7,62 ppm foi atribuído a H4 devido à correlação com o carbono a 128,58 ppm (C6).

Os sinais a 7,52 ppm e 7,21 ppm correspondem ao anel aromático *para* dissustituído e a atribuição foi feita aos prótons H2'-H6' e H3'-H5', respetivamente. Tanto os prótons H2'-H6' como os H3'-H5' são quimicamente equivalentes entre si por isso não se observa variação dos desvios químicos. A correlação entre o sinal a δ 129,67 ppm e o sinal do grupo metileno a δ 3,98 ppm permitiu atribuí-lo a C3'-C5', e por consequência atribuir o sinal a 7,21 ppm a H3'-H5'. No espectro COSY verificou-se que os prótons a 7,21 ppm acoplam com os prótons a 7,52 ppm o que permite atribuir este último sinal a H2'-H6'. Pela análise do espectro de HMBC conseguiram-se atribuir os carbonos quaternários: o sinal de 135,25 ppm foi atribuído ao carbono C1' devido às correlações existentes com os prótons a 7,52 ppm e o sinal a 138,25 ppm que apresentava uma correlação com o próton a 7,52 ppm e também com o sinal a 3,98 ppm foi atribuído ao C4'.

Os sinais do último anel aromático aparecem no espectro de ^1H RMN num multipeto entre 7,19 ppm e 7,20 ppm, e a 7,30 ppm. O sinal a δ 7,30 ppm pela sua integração e multiplicidade foi atribuído a H3''-H5'', e confirmado com o sinal do carbono C1''. O sinal a 128,86 ppm diretamente ligado ao próton com sinal a 7,19 ppm foi atribuído a C2''-C6'' devido à sua correlação com os prótons a δ 3,98 ppm. O sinal a 126,15 ppm foi atribuído por exclusão de partes a C4''. O sinal a 141,03 ppm foi atribuído ao carbono C1'' devido às correlações existentes com os prótons a 7,30 ppm e 3,98 ppm. A Figura 2.2 representa as principais correlações de COSY e de HMBC no composto **3.a**.

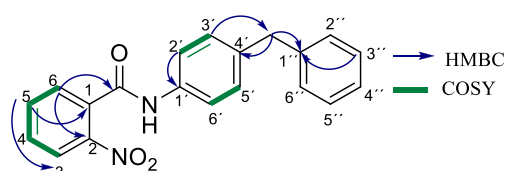


Figura 2.2- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto **3.a**.

Para comprovar a conformação maioritária do composto **3.a** em solução realizou-se uma experiência de NOESY, utilizando DMSO- d_6 como solvente, e verificou-se que a benzanilida se apresenta unicamente na conformação *trans* (Figura 2.3), pois o próton NH correlacionou-se com os prótons H6 e H2'-H6' como pode ser observado na Figura 2.3.

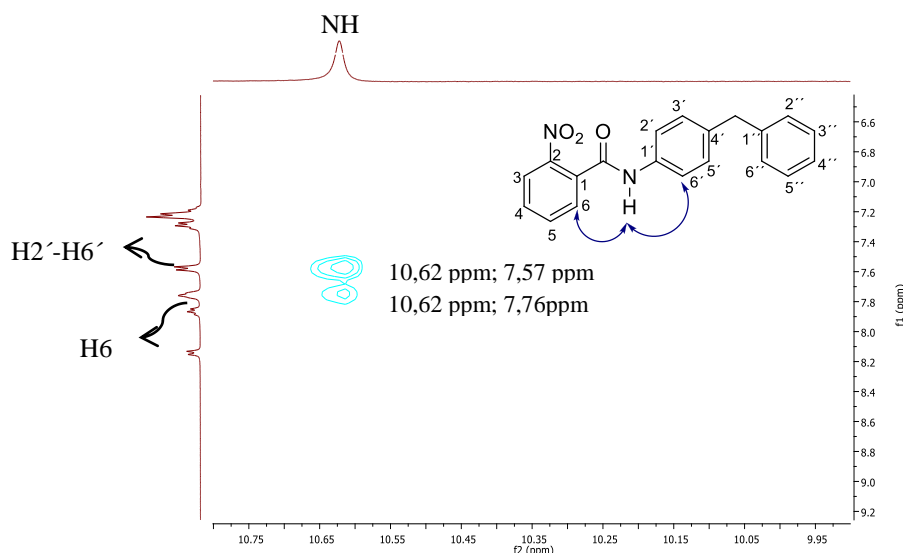


Figura 2.3- Ampliação do espectro de NOESY do composto 3.a em DMSO- d_6 e estrutura numerada da conformação do composto 3.a. As setas a azul representam as correlações dos prótons como grupo NH observadas no NOESY.

O espectro de IV permitiu uma confirmação dos grupos funcionais presentes no composto 3.a. A Tabela 2.3 apresenta os números de onda das principais bandas presentes no espectro de IV (Anexo 6).

Tabela 2.3- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.a

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3302	Elongação N-H
3021	Elongação C-H aromática
1647	Elongação C=O
1593	Elongação C-C aromática
1523	Elongação NO ₂
1493 – 1450	Elongação CH ₂ e CH ₃
1362	Elongação C-NO ₂
838 – 695	Torção C-H

2.1.1.2. N-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida

O segundo passo reacional da síntese do composto *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida 4.a consistiu na tionação da benzanilida 3.a utilizando o LR, de acordo com o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2.1. As tiobenzanilidas foram caracterizadas pelas técnicas espectroscópicas de RMN (¹H, ¹³C-APT e técnicas bidimensionais COSY, HSQC, HMBC) IV e ESI-HRMS.

Os rendimentos das tiobenzanilidas são reportados à quantidade de produto bruto purificado. Foram purificados 0,500 g de produto bruto obtendo-se o produto purificado com um rendimento de 57,9%.

Pela análise dos espectros de ¹H RMN em CDCl₃ observou-se que existiam mais sinais do que aqueles que se esperava, havendo uma duplicação de praticamente todos os sinais previstos. De modo a despistar a possibilidade de estes duplicados corresponderem a impurezas realizou-se uma análise por ESI-HRMS (Anexo 7) do composto e diversas c.c.f. em vários eluentes não tendo sido detectadas quaisquer impurezas. Realizou-se posteriormente um espectro de ¹H RMN em DMSO- d_6 tendo-se verificado que a intensidade dos sinais duplicados decrescia consideravelmente. Embora as condições de realização dos espectros não fossem quantitativas, a comparação dos picos homólogos era, nos dois solventes, consistente para todos os sinais duplicados, sendo a intensidade relativa em CDCl₃ cerca de 1:0,6 e em DMSO- d_6 de 1:0,1. Esta diferença de rácios das intensidades dos sinais em solventes

diferentes sugeriu que o composto sintetizado existisse em solução como um equilíbrio entre dois rotâmeros, tal como está descrito na literatura para este tipo de compostos ²⁹. A análise dos espectros de RMN em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆ permitiu confirmar a existência de duas espécies em solução que não se interligavam entre si mas que possuíam estruturas similares dada a pequena diferença de desvios químicos entre os respectivos sinais. A análise dos espectros de RMN em CDCl₃, Tabela 2.4 e Tabela 2.5, permitiu atribuir os sinais de cada espécie, estando os espectros apresentados nos Anexo 8 a Anexo 12. A Figura 2.4 apresenta o composto **4.a** numerado de acordo com as regras utilizadas na benzanilida anterior.

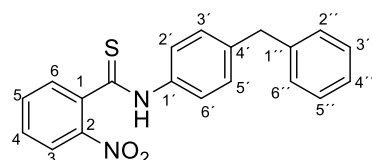


Figura 2.4- Estrutura e numeração do composto **4.a**.

Tabela 2.4- Dados de RMN, ¹H e COSY, do composto **4.a** em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
9,80	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
8,95	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,02	Dupleto	8,2	1H <i>trans</i>	7,52	H3 <i>trans</i>
7,91	Dupleto	8,2	1H <i>cis</i>	7,40	H3 <i>cis</i>
7,67	Dupleto	8,5	3H <i>trans</i>	7,26	H2'-H6' <i>trans</i>
7,64	Multipleteo	-		7,56	H5 <i>trans</i>
7,56	Dupleto de dupleto	7,7; 1,4	1H <i>trans</i>	7,64	H6 <i>trans</i>
7,52	Multipleteo		2H <i>trans</i>	8,02; 7,64	H4 <i>trans</i>
7,51			1H <i>cis</i>	7,40	H5 <i>cis</i>
7,40	Tripleteo de dupleto	8,5; 1,4	1H <i>cis</i>	7,91; 7,51	H4 <i>cis</i>
7,34	Multipleteo	-	1H <i>cis</i>	-	H6 <i>cis</i>
7,32			2H <i>trans</i>	-	H3''-H5'' <i>trans</i>
7,27			2H <i>trans</i>	7,32	H2''-H6'' <i>trans</i>
7,26			2H <i>trans</i>	7,67	H3'-H5' <i>trans</i>
			2H <i>cis</i>	-	H3''-H5'' <i>cis</i>
7,22			1H <i>trans</i>	-	H4'' <i>trans</i>
7,21			1H <i>cis</i>	-	H4'' <i>cis</i>
7,07	Dupleto	7,0	2H <i>cis</i>	7,26	H2''-H6'' <i>cis</i>
6,98	Dupleto	8,5	2H <i>cis</i>	6,82	H3'-H5' <i>cis</i>
6,82	Dupleto	8,3	2H <i>cis</i>	6,98	H2'-H6' <i>cis</i>
4,01	Singuleto	-	2H <i>trans</i>	-	CH ₂ <i>trans</i>
3,86	Singuleto	-	2H <i>cis</i>	-	CH ₂ <i>cis</i>

Tabela 2.5- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.a em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
198,13	C	-	7,34	$\text{C}=\text{S}_{cis}$
194,98	C	-	7,56	$\text{C}=\text{S}_{trans}$
145,35	C	-	7,91; 7,40; 7,51	C2_{cis}
145,04	C	-	8,02; 7,56	C2_{trans}
140,59	C	-	7,67	$\text{C4}'_{trans}$
140,46	C	-	6,82; 3,86	$\text{C4}'_{cis}$
140,40	C	-	7,32; 4,01	$\text{C1}''_{trans}$
140,05	C	-	7,26; 3,85	$\text{C1}''_{cis}$
139,27	C	-	8,95; 8,02; 7,64	C1_{trans}
136,25	C	-	7,91; 7,51	C1_{cis}
136,13	C	-	7,26	$\text{C1}'_{trans}$
135,78	C	-	6,98	$\text{C1}'_{cis}$
133,74	CH	7,64	8,02	C5_{trans}
133,48	CH	7,51	7,91	C5_{cis}
129,76	CH	6,98	6,97; 3,85	$\text{C3}'-\text{C5}'_{cis}$
129,74	CH	7,52	7,58	C4_{trans}
129,57	CH	7,40	7,50	C4_{cis}
129,52	CH	7,26	4,01	$\text{C3}'-\text{C5}'_{trans}$
128,94	CH	7,34	-	C6_{cis}
128,93	CH	7,56	-	C6_{trans}
128,90	CH	7,27	4,01	$\text{C2}''-\text{C6}''_{trans}$
128,81	CH	7,07	3,86	$\text{C2}''-\text{C6}''_{cis}$
128,56	CH	7,32	-	$\text{C3}''-\text{C5}''_{trans}$
128,51	CH	7,26	7,07	$\text{C3}''-\text{C5}''_{cis}$
126,29	CH	7,21	-	$\text{C4}''_{trans}$
126,25	CH	7,22	-	$\text{C4}''_{cis}$
124,72	CH	8,02	7,52; 7,64	C3_{trans}
124,59	CH	7,91	7,34	C3_{cis}
123,71	CH	7,67	8,95; 7,26	$\text{C2}'-\text{C6}'_{trans}$
123,55	CH	6,82	9,80; 6,82	$\text{C2}'-\text{C6}'_{cis}$
41,52	CH_2	4,01	7,27; 7,26	CH_2_{trans}
41,37	CH_2	3,86	7,07; 6,98	CH_2_{cis}

Comparando os espectros de RMN do composto **4.a**, realizado em CDCl_3 , com os da respectiva benzanilida verifica-se que a substituição do grupo $\text{C}=\text{O}$ pelo grupo mais volumoso $\text{C}=\text{S}$, provocou alguns desvios significativos nos sinais de alguns prótons e carbonos. No rotâmetro *trans* o próton NH sendo muito lábil deslocou-se para campo mais baixo apresentando-se como um singuleto a 8,95 ppm enquanto na benzanilida aparecia a 7,42 ppm. Os prótons do anel benzoílico não sofreram uma alteração muito significativa havendo um ligeiro desvio dos prótons H6, H5 e H4 para campo alto (H5- multipeto a 7,64 ppm, H6- multipeto a 7,56 ppm e H4- multipeto a 7,52 ppm): o próton H3 foi o que sofreu uma menor alteração apresentando uma diferença de desvio químico de cerca de 0,10 ppm (H3-dupeto a 8,02 ppm). Seguindo a mesma linha de raciocínio da atribuição dos sinais da correspondente benzanilida, os sinais de carbono foram atribuídos pela análise de HSQC, onde se verificou um desvio considerável, cerca de 1 ppm, no carbono C4 (130,80 ppm). Para além de C4 os carbonos quaternários deste anel também sofreram um grande desvio aparecendo a δ 145,04 ppm e a 139,27 ppm correspondentes ao C2 e ao C1 respetivamente. O carbono do tiocarbonilo (194,98 ppm),

tal como esperado, apresentou uma diferença significativa comparativamente ao sinal do C=O (164,74 ppm). No anel aromático *para* dissustituído os carbonos quaternários (C1' e C4') e o C2'-C6' sofrendo um desblindamento, aparecendo a δ 140,59 ppm, 136,13 ppm e a 123,71 ppm correspondentes a C4', C1' e a C2'-C6' respectivamente. No último anel aromático mais uma vez foi o carbono quaternário que sofreu um deslocamento maior tendo-se deslocado para campo mais alto (140,59 ppm). A Figura 2.5 representa as principais correlações de COSY e de HMBC do composto **4.a trans**.

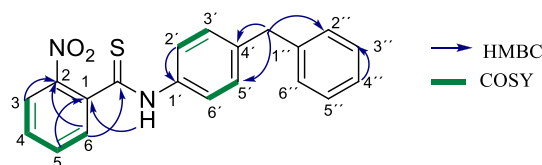


Figura 2.5- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC para o rotâmero *trans* do composto **4.a**.

Os sinais do rotâmero *cis* foram atribuídos utilizando as mesmas experiências utilizadas na caracterização do rotâmero *trans*. O sinal do NH do rotâmero *cis* apareceu a δ 9,80 ppm provavelmente devido à rotação da ligação C(=S)-NH não ser influenciada pelo cone de blindagem do grupo tiocarbonilo, apresentando assim, um desvio químico maior do que o NH do rotâmero *trans* (8,95 ppm). O carbono do tiocarbonilo devido à rotação da ligação C(=S)-NH desblindou, surgindo a δ 198,13 ppm²⁹. Comparando os prótons do rotâmero *trans* do anel benzoílico com os prótons equivalentes ao rotâmero *cis* é possível verificar que os prótons do rotâmero *cis* sofreram todos um deslocamento para campo mais alto. O próton H6 *cis* foi aquele que se deslocou mais, cerca de 0,20 ppm aparecendo a δ 7,34 ppm. Em relação aos carbonos deste anel aromático verificou-se que o C2 *cis* (145,35 ppm) apareceu a um desvio químico maior que o correspondente do rotâmero *trans* (145,04 ppm), tal como o carbono C6 *cis* que surgiu com um desvio químico de 128,93 ppm. Neste anel aromático o carbono que sofreu um desvio maior devido à rotação da ligação C(=S)-NH foi o carbono C1 *cis* aparecendo a δ 136,25 ppm.

Os sinais do anel aromático *para* dissustituído, H2'-H6' e H3'-H5', surgem a campo mais alto no espectro de ¹H RMN, aparecendo na forma de um sistema AA'XX' a 6,98 ppm e 6,82 ppm, respectivamente. Neste anel aromático o carbono que sofreu maior desvio foi o C1', surgindo a δ 135,78 ppm. Os carbonos C3'-C5' *cis* apareceram a campo mais baixo comparativamente com o C3'-C5' *trans* (129,52 ppm).

No último anel aromático conseguiu-se atribuir o sinal a 7,07 ppm aos prótons H2''-H6'' e os restantes prótons surgiram num multipeto. No entanto pela análise do espectro HMBC conseguiu-se atribuir os desvios químicos de cada próton dentro do multipeto, os prótons H3''-H5'' surgiram a δ 7,26 ppm e o próton H4'' apareceu a δ 7,21 ppm. No que diz respeito aos desvios químicos dos carbonos não se encontraram diferenças significativas comparativamente aos observados para os do rotâmero *trans*. A Figura 2.6 representa as principais correlações de COSY e de HMBC do rotâmero **4.a cis**.

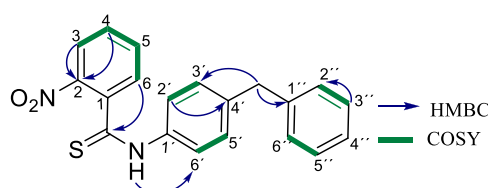


Figura 2.6- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do rotâmero *cis* do composto **4.a**.

De acordo com a literatura⁴⁰, as diferenças de desvios químicos existentes entre os sinais dos dois rotâmeros devem-se ao facto de existir ortogonalidade entre os planos do grupo nitrofenilo e o grupo tioamida e como consequência, no rotâmero *cis* os prótons do grupo *N*-fenilo ficam sob o efeito do cone de blindagem do grupo benzoílico aparecendo assim a campo alto nos espectros de RMN. A Figura 2.7 representa um esquema ilustrativo do efeito de cone de blindagem do anel aromático para ambos os rotâmeros. No composto **4.a** esta teoria não é válida para os carbonos C6, C5 e C3'-C5', dado que os carbonos C6 e C3'-C5' do rotâmero *cis* deveriam aparecer a campo mais alto comparativamente com o carbono correspondente do rotâmero *trans* enquanto o C5 deveria aparecer a campo mais baixo. No entanto, os desvios em RMN de carbono são o resultado de muitos efeitos, e a complexidade da disposição espacial dos vários grupos, em cada rotâmero deve favorecer a maior estabilidade possível, pode determinar a diferença nos desvios dos carbonos entre os dois isómeros.

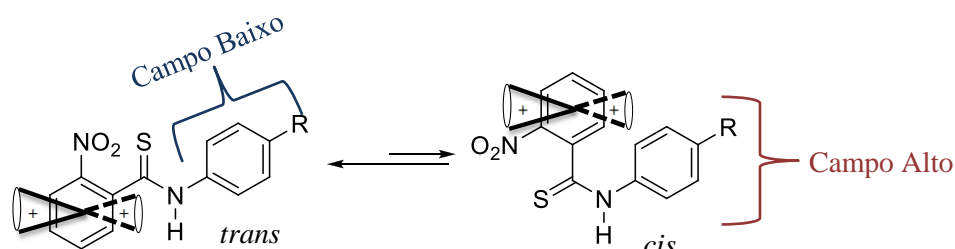


Figura 2.7- Cone de blindagem em RMN de tiobenzanilidas.

A existência de rotâmeros em solução é geralmente confirmada fazendo experiências de RMN a temperatura variável uma vez que é espectável, segundo a literatura²⁹ que haja a coalescência dos sinais com o aumento da temperatura. Este fenómeno ocorre porque a barreira energética para a rotação do grupo tioamida é grande fazendo com que o rotâmero *cis* à temperatura ambiente não consiga passar tão facilmente a barreira energética, daí haver um equilíbrio entre o *cis* e o *trans*. Porém quando se fornece energia ao sistema, com o aumento da temperatura, o rotâmero *cis* já possui energia suficiente para passar esta barreira convertendo-se no rotâmero *trans* que é termodinamicamente mais estável. Uma vez que a temperatura de coalescência é geralmente elevada os espectros têm que ser realizados em solventes deuterados com um ponto de ebulição elevado, como por exemplo DMSO-*d*₆. Assim, realizou-se a caracterização do composto **4.a** em DMSO-*d*₆ (Tabela 2.6 e Tabela 2.7) para posteriormente se poder realizar as referidas experiências. Os espectros de RMN ¹H, ¹³C-APT, COSY, HSQC e HMBC para o composto **4.a** podem ser consultados nos Anexo 13 a Anexo 17, respetivamente.

Tabela 2.6- Dados de RMN, ¹H e COSY, do composto 4.a em DMSO-*d*₆.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
12,58	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
12,25	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,08	Dupleto	8,2	1 <i>H</i> <i>trans</i>	7,65	H3 <i>trans</i>
7,97	Dupleto	4,1	1 <i>H</i> <i>cis</i>	7,50	H3 <i>cis</i>
7,80	Multipleteo	-	3 <i>H</i> <i>trans</i>	7,61	H5 <i>trans</i>
7,79				7,30	H2'-H6' <i>trans</i>
7,65	Multipleteo	7,7	1 <i>H</i> <i>trans</i>	8,08	H4 <i>trans</i>
7,61			1 <i>H</i> <i>trans</i>	7,80	H6 <i>trans</i>
7,58			1 <i>H</i> <i>cis</i>	-	H5 <i>cis</i>
7,50	Tripleteo	8,2	1 <i>H</i> <i>cis</i>	7,97	H4 <i>cis</i>
7,30	Multipleteo	-	2 <i>H</i> <i>trans</i>	7,79; 3,96	H3'-H5' <i>trans</i>
7,33 – 7,22			2 <i>H</i> <i>trans</i>	-	H2''-H6'' <i>trans</i>
			2 <i>H</i> <i>trans</i>	-	H3''-H5'' <i>trans</i>
			2 <i>H</i> <i>cis</i>	-	H3''-H5'' <i>cis</i>
			1 <i>H</i> <i>cis</i>	-	H6 <i>cis</i>
7,19	Tripleteo	7,1	1 <i>H</i> <i>trans</i>	-	H4'' <i>trans</i>
			1 <i>H</i> <i>cis</i>	-	H4'' <i>cis</i>
7,13	Dupleto	8,2	2 <i>H</i> <i>cis</i>	-	H2''-H6'' <i>cis</i>
7,05	Dupleto	8,4	2 <i>H</i> <i>cis</i>	6,91	H3'-H5' <i>cis</i>
6,91	Dupleto	8,4	2 <i>H</i> <i>cis</i>	7,05	H2'-H6' <i>cis</i>
3,96	Singuleto	-	2 <i>H</i> <i>trans</i>	7,30	CH ₂ <i>trans</i>
3,82	Singuleto	-	2 <i>H</i> <i>cis</i>	-	CH ₂ <i>cis</i>

Tabela 2.7- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.a em DMSO- d_6 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
195,84	C	-	7,33 – 7,22	C=S <i>cis</i>
193,23	C	-	7,61; 8,08	C=S <i>trans</i>
145,77	C	-	7,26; 7,50	C2 <i>cis</i>
145,08	C	-	8,08; 7,79; 7,61	C2 <i>trans</i>
141,13	C	-	7,29; 3,96;	C1'' <i>trans</i>
140,82	C	-	3,82	C1'' <i>cis</i>
139,80	C	-	7,79; 3,96	C4' <i>trans</i>
139,57	C	-	6,91	C4' <i>cis</i>
139,09	C	-	12,25; 8,02	C1 <i>trans</i>
137,30	C	-	7,79; 7,30	C1' <i>trans</i>
137,17	C	-	7,58	C1 <i>cis</i>
136,87	C	-	7,05; 12,58	C1' <i>cis</i>
133,93	CH	7,80	8,08	C5 <i>trans</i>
133,81	CH	7,58	7,97	C5 <i>cis</i>
129,80	CH	7,65	7,61	C4 <i>trans</i>
129,63	CH	7,50	7,58	C4 <i>cis</i>
129,27	CH	7,05	7,50	C3'-C5' <i>cis</i>
129,08	CH	7,61	7,65	C6 <i>trans</i>
128,96	CH	7,30	-	C3'-C5' <i>trans</i>
128,71	CH	7,25	7,30; 3,96	C3''-C5'' <i>trans</i>
128,64	CH	7,13	7,13; 3,82	C2''-C6'' <i>cis</i>
128,52	CH	7,33 – 7,22	-	C2''-C6'' <i>trans</i>
128,46	CH	7,33 – 7,22	-	C6 <i>cis</i>
126,39	CH	7,33 – 7,22	-	C3''-C5'' <i>cis</i>
126,08	CH	7,19	7,33 – 7,22	C4'' <i>trans</i>
				C4'' <i>cis</i>
124,64	CH	7,97	-	C3 <i>cis</i>
124,33	CH	8,08	7,79	C3 <i>trans</i>
123,52	CH	6,91	-	C2'-C6' <i>cis</i>
123,12	CH	7,79	12,25; 7,79; 7,30	C2'-C6' <i>trans</i>
40,71	CH ₂	3,96	7,30; 7,25	CH ₂ <i>trans</i>
40,29	CH ₂	3,82	7,05; 7,13	CH ₂ <i>cis</i>

Realizou-se igualmente uma experiência de NOESY, utilizando DMSO- d_6 como solvente, de modo a confirmar que o rotâmero maioritário correspondia ao rotâmero *trans*, tal como postulado. Desta forma averiguou-se que o próton NH do rotâmero maioritário apresentava uma correlação com os prótons H6 e H2'-H6', enquanto no rotâmero minoritário o próton NH só se correlacionava com o H2'-H6' como pode ser observado na Figura 2.8. A Figura 2.9 ilustra o equilíbrio entre os rotâmeros e as correlações com os prótons NH observadas no NOESY.

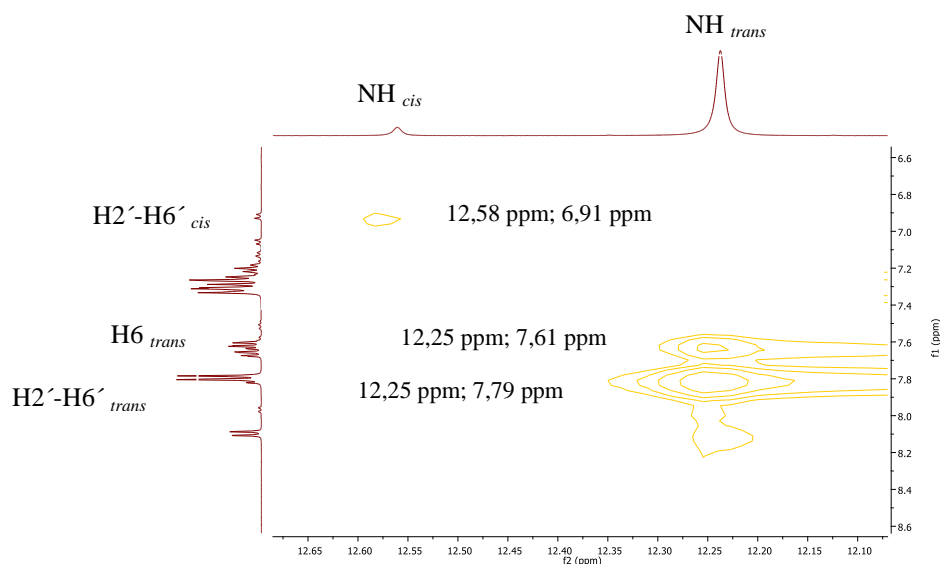


Figura 2.8- Ampliação do espectro de NOESY do composto 4.a (DMSO- d_6 , 25°C).

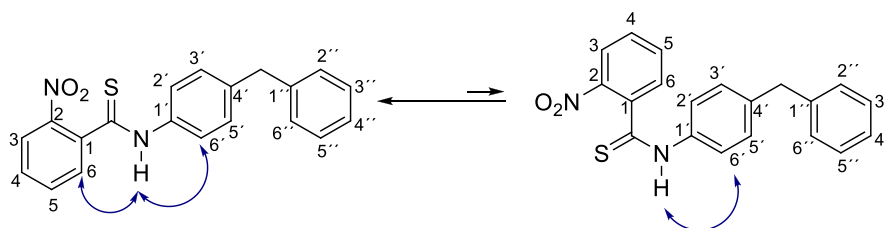


Figura 2.9- Equilíbrio entre os rotâmeros *trans* e *cis*.

As setas a azul representam as correlações com os grupos NH de cada rotâmero.

A experiência de ^1H RMN com variação da temperatura foi realizada utilizando um intervalo de temperatura de 25 a 115°C (298,15-388,15 K). À medida que se foi aumentando a temperatura foi possível verificar a interconversão gradual dos sinais menos intensos nos mais intensos, Figura 2.10. O aumento da temperatura favorece o rotâmero *trans* termodinamicamente mais favorável.

Neste estudo monitorizaram-se os prótons do grupo CH_2 e os prótons H3 uma vez que são os mais bem definidos. A interconversão dos sinais começou a observar-se aos 70 °C (343,15 K) verificando-se também que os sinais do rotâmero maioritários perdiam resolução não surgiram tão definidos. À temperatura de 115°C (390K) deu-se a coalescência total dos sinais, aparecendo apenas os sinais correspondentes a uma espécie em solução. Quando a solução foi arrefecida, obtendo os espectros a 85 °C e 25°C (358,15 e 298,15, respetivamente) constatou-se que as duas séries de duplicados foram restauradas, Figura 2.11. Este resultado confirmou que no estado líquido estes compostos exibem um equilíbrio entre o rotâmero *trans* e *cis*. Espetroscopicamente este tipo de rotâmeros manifestam-se devido à rotação lenta na escala de RMN mas em laboratório é impossível isolar as duas espécies devido à rápida rotação na escala de tempo do laboratório ²⁹.

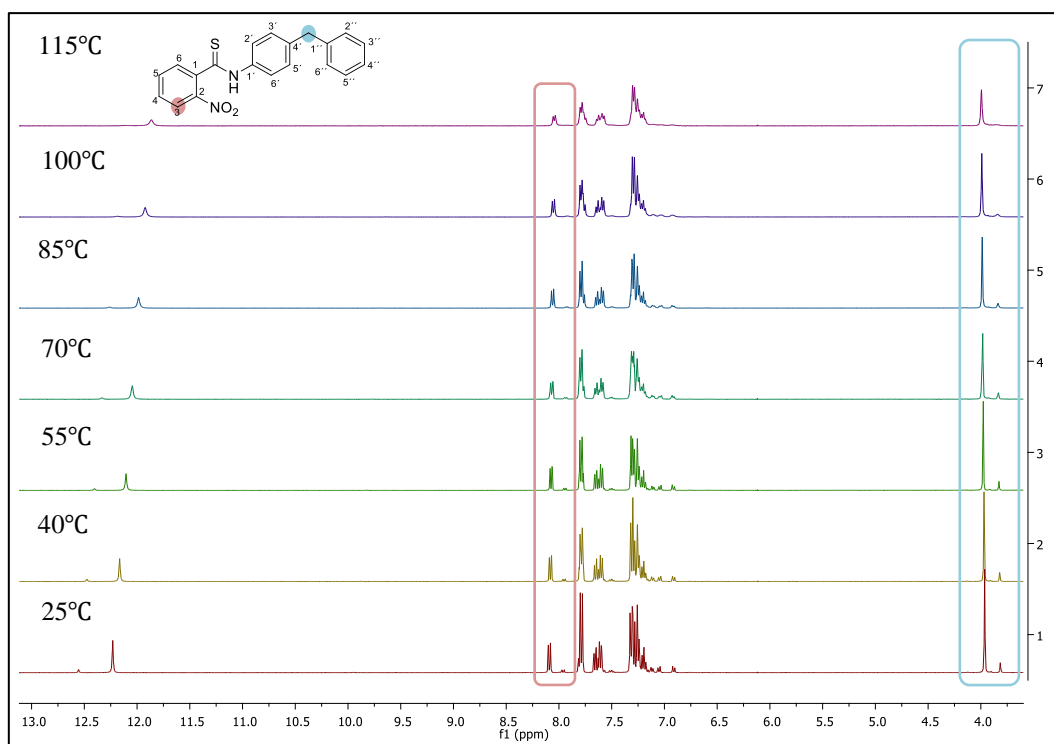


Figura 2.10- Ampliação dos espectros de ^1H RMN com variação de temperatura do composto **4.a** ($\text{DMSO}-d_6$, 25-115°C).

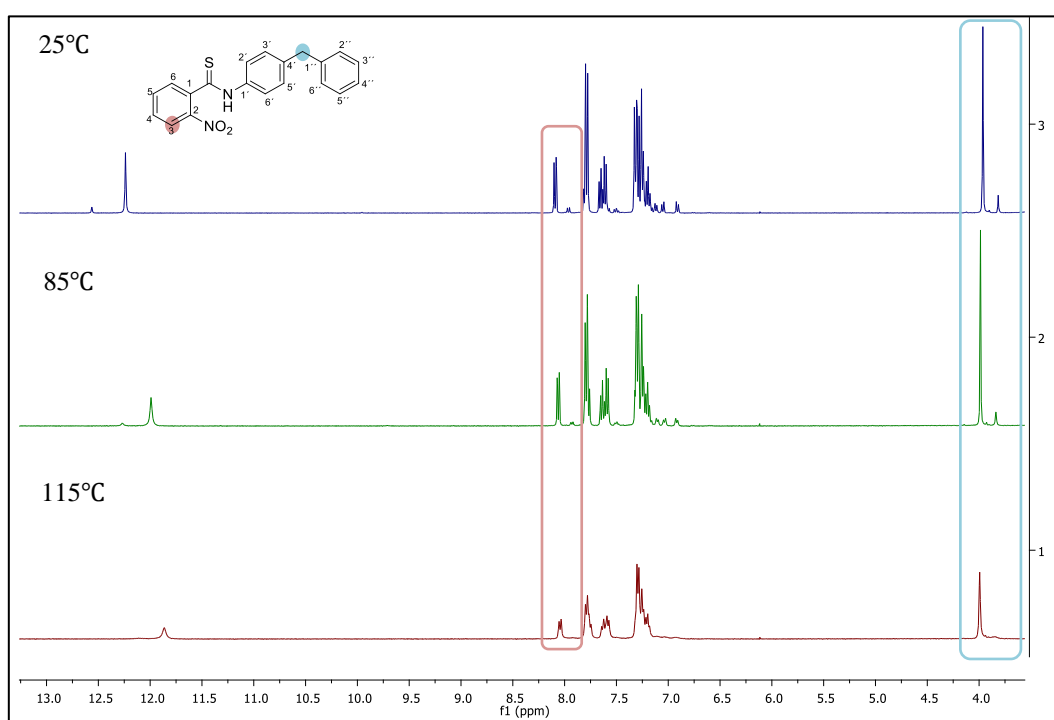


Figura 2.11- Ampliação dos espectros de ^1H RMN com variação de temperatura do composto **4.a** ($\text{DMSO}-d_6$, 115-25°C).

Para confirmar que no estado sólido a conformação adotada do composto **4.a** era a conformação *trans* fez-se um espectro de difração de raio-X de monocristal do composto, representando a Figura 2.12 a estrutura obtida nessa análise.

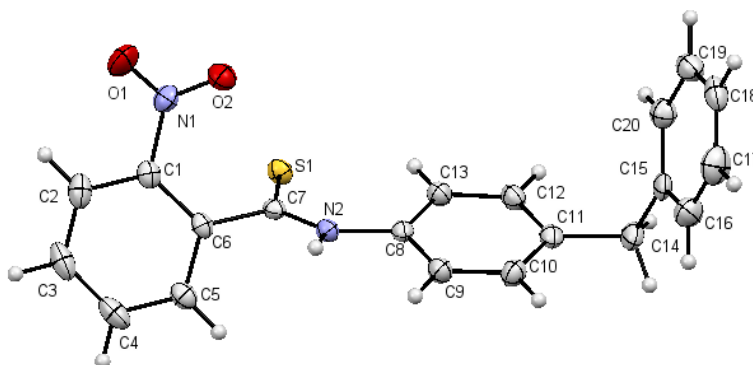


Figura 2.12- Representação ORTEP da estrutura do composto 4.a com o respectivo esquema de numeração atômica.

O grupo espacial do composto **4.a** é $P 2_1/c$. Os valores dos parâmetros de malha (a, b e c) são todos diferentes entre si, sendo o $a = 14,6563(5)$, $b = 7,5969(3)$ e $c = 15,8216(6)$, e os ângulos alfa e gama são iguais e o beta diferente ($\alpha = 90^\circ$, $\beta = 105.192(2)^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$) o que permitiu concluir que o tipo de estrutura deste composto é monoclinica. O Z e o Z' são iguais a zero e a célula tem um volume de $1700,0 \text{ \AA}^3$. Com a estrutura de raio-X averiguou-se que o grupo C6-C7-S1 está ligeiramente torcido afastando-se do grupo NO_2 , o que é comprovado pelos ângulos entre C1-C6-C7 e C5-C6-C7, em que o ângulo formado por C5-C6-C7 ($119,8(1)^\circ$) é menor que o ângulo formado por C1-C6-C7 ($122,9(1)^\circ$). Com esta estrutura, também foi possível observar que o substituinte benzilo na posição *para* do anel aromático dissustituído toma uma posição oblíqua em relação a este (C11-C14-C15- $121,2(1)^\circ$). Outra informação estrutural que se pode retirar desta análise é que o ângulo N2-C8-C9 é menor que o N2-C8-C13 o que é indicativo que o anel dissustituído na posição *para* apresenta uma torção que o aproxima do C=S e o afasta do NH.

Da análise detalhada dos parâmetros atrás descritos foi possível confirmar que no estado sólido o composto **4.a** se apresenta apenas na conformação *trans*, mais estável, a qual é também predominante em solução. As Tabela 2.8 e Tabela 2.9 compilam os valores das distâncias e dos ângulos entre os átomos do composto **4.a**, respetivamente.

Tabela 2.8- Distâncias entre os átomos do composto 4.a segundo o raio-X

Átomos	Distâncias (Å)
O1-N1	1,224(2)
N1-C1	1,469(2)
C6-C7	1,496(2)
C7-S1	1,669(2)
C6-S1	2,723(1)
C7-N2	1,335(2)
N2-S1	2,703(1)
N2-C8	1,420(2)
C11-C14	1,516(2)

Tabela 2.9- Ângulos entre os átomos do composto 4.a segundo o raio-X

Átomos	Ângulos (°)
O1-N1-O2	123,9(1)
O1-N1-C1	118,0(1)
N1-C1-C6	120,0(1)
C1-C6-C7	122,9(1)
C5-C6-C7	119,8(1)
C6-C7-S1	111,6(1)
C6-C7-N2	113,4(1)
S1-C7-N2	117,9(1)
N2-C8-C9	115,4(1)
N2-C8-C13	125,0 (1)
C12-C11-C14	121,2(1)
C11-C1-C15	119,9(1)
C14-C15-C16	121,2(1)

* Os átomos foram numerados no programa Mercury 3.8, não havendo qualquer relação com a numeração atribuída de acordo com as regras da IUPAC.

A informação obtida pelo espectro de IV (Tabela 2.10) permitiu confirmar os grupos funcionais presentes no composto **4.a**, os espectros podem ser consultado no Anexo 18.

Tabela 2.10- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.a.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3218	Elongação N-H
3183 – 2831	Elongação C-H aromática
1601	Elongação C-C aromática
1528	Elongação NO ₂
1354	Elongação C-NO ₂
1206	Elongação C=S
853 – 625	Torção C-H

Pelo espectro de ESI-HRMS obtido em modo positivo do composto **4.a**, Anexo 19, foi possível verificar a existência de um pico correspondente ao pico da molécula protonada [M+H⁺] com m/z = 349,1002 (C₂₀H₁₇N₂O₂S) correspondente à estrutura prevista para o composto **4.a**.

2.1.2. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-(4-fenoxifenil)benzotioamida, **4.b**

2.1.2.1. 2-Nitro-*N*-(4-fenoxifenil)benzoamida

À semelhança do composto **4.a**, o composto 2-nitro-*N*-(4-fenoxifenil)benzotioamida **4.b** foi sintetizado em dois passos reacionais, começando-se por sintetizar a *N*-(4-fenoxifenil)-2-nitrobenzamida **3.b** por reação entre o cloreto 2-nitrobenzoílo **1.a** e da 4-fenoxianilina **2.b**, de acordo com o procedimento geral descrito no ponto 3.3.1.2. O composto foi obtido com um rendimento de 47,4%, a Figura 2.13 ilustra a estrutura numerada do composto do **3.a**.

O composto foi caracterizado pelas mesmas técnicas espectroscópicas que o composto **3.a**. À semelhança do composto **3.a** a atribuição dos sinais de RMN ¹H e ¹³C (Tabela 2.11 e Tabela 2.12) realizou-se recorrendo as experiências ¹³C-APT, COSY, HMBC e HSQC (Anexo 20 a Anexo 24).

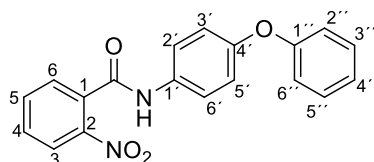


Figura 2.13- Estrutura numerada do composto 3.b.

Tabela 2.11- Dados de RMN, ¹H e COSY, do composto 3.b em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
8,09	Dupleto	8,2	1H	7,60	H3
7,70	Multiplete	-	-	-	H5 NH
7,62	Multiplete	-	2H	-	H6
7,60				8,09	H4
7,53	Dupleto	8,9	2H	7,01	H2'-H6'
7,34	Triplete	8,0	2H	7,01; 7,11	H3''-H5''
7,11	Triplete	7,4	1H	7,34	H4''
7,01	Dupleto	7,9	4H	7,53	H3'-H5'
				7,34	H2''-H6''

Tabela 2.12- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto **3.b** em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
164,43	C	-	7,62	C=O
157,29	C	-	7,34; 7,01	C1''
154,27	C	-	7,53; 7,01	C4'
146,24	C	-	8,09; 7,62; 7,60	C2
133,94	CH	7,70	8,09	C5
132,75	C	-	7,53; 7,01	C1'
130,76	CH	7,60	7,62	C4
129,77	CH	7,34	7,34; 7,11	C3''-C5''
128,61	CH	7,62	7,60	C6
124,70	CH	8,09	7,70	C3
123,26	CH	7,11	7,01	C4''
122,31	CH	7,53	7,70 (NH)	C2'-C6'
119,59	CH	7,01	7,01	C3'-C5'
118,59	CH	7,01	7,34; 7,11	C2''-C6''

Uma vez que a única diferença estrutural entre os compostos **3.a** e **3.b** é a substituição do grupo benzilo em C4' por um grupo fenoxilo, as alterações mais significativas nos espectros de RMN podem ser atribuídas a esta substituição. O facto de se ter substituído o grupo metileno de **3.a** por um elemento mais eletronegativo, o oxigénio, fez com que os desvios químicos de ^1H e ^{13}C dos anéis aromáticos diretamente ligados ao oxigénio variassem, enquanto os desvios químicos do anel benzoílico não sofressem desvios relevantes. Os prótons H3'-H5' e H2''-H6'' apareceram num mesmo multipeto a δ 7,01 ppm, devido à sua vizinhança química semelhante, e comparativamente à benzanilida **3.a** aparecem ligeiramente mais blindados. Este fenómeno é explicado pelo facto destes prótons possuírem elevadas densidades eletrónicas devido ao efeito mesomérico (+M) induzido pelo oxigénio, efeito esse que provoca também um desvio para campo mais alto dos respetivos carbonos δ 119,59 ppm (C3'-C5') e a 118,59 ppm (C2''-C6''). Dos restantes prótons destes anéis aromáticos apenas o H4'' é que sofreu um desvio significativo, deslocando-se para campo mais alto, aparecendo a δ 7,11 ppm. Os carbonos quaternários diretamente ligados ao oxigénio, C4' e C1'', sofreram os desblindamentos significativos aparecendo δ 154,27 ppm e a 157,29 ppm, respetivamente. Embora os desvios químicos dos carbonos sejam um efeito complexo de hibridização, eletronegatividade e anisotropia, o oxigénio pode retirar densidade eletrónica por efeito indutivo (-I) e simultaneamente por efeito mesomérico conferir algum carácter de carbonilo a estes carbonos, justificando assim os elevados desvios químicos. Na Figura 2.14 estão representadas as principais correlações COSY e HMBC do composto **3.b**.

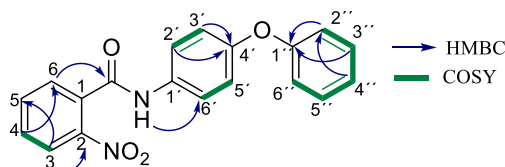


Figura 2.14- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto **3.b**.

A análise do espectro de IV (Anexo 25) do composto **3.b** confirmou a presença dos grupos funcionais esperados. A Tabela 2.13 apresenta os números de onda das bandas características dos principais grupos funcionais.

Tabela 2.13- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.b.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3281	Elongação N-H
3037	Elongação C-H aromática
1652	Elongação C=O
1522	Elongação NO ₂
1361	Elongação C-NO ₂
1014	Elongação C-O-C
873 – 688	Torção C-H

2.1.2.2. 2-Nitro-N-(4-fenoxifenil)tiobenzoamida

A obtenção do composto 2-nitro-N-(4-fenoxifenil)benzotioamida **4.b** seguiu o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2.2. O rendimento obtido pela purificação de 0,774 g do produto foi de 45,0%. A Figura 2.15 ilustra a estrutura numerada do composto **4.b**.

A caracterização do composto **4.b** foi feita utilizando as mesmas técnicas do composto **4.a**. A atribuição dos sinais de RMN ¹H e de ¹³C em CDCl₃ está compilada nas Tabela 2.14 e Tabela 2.15 (Anexo 26 a Anexo 30).

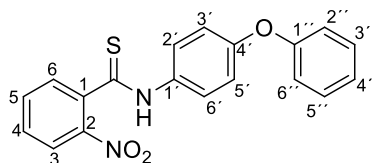


Figura 2.15- Estrutura numerada do composto 4.b.

Tabela 2.14- Dados de RMN, ¹H e COSY do composto 4.b em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
9,90	Singuleto	-	-	-	NH _{cis}
9,07	Singuleto	-	-	-	NH _{trans}
8,03	Dupleto	8,2	1H _{trans}	7,52	H3 _{trans}
7,92	Dupleto	8,2	1H _{cis}	7,42	H3 _{cis}
7,69	Multiplete	-	3H _{trans}	7,04	H2'-H6' _{trans}
7,65				7,56	H5 _{trans}
7,56	Multiplete	-	1H _{trans}	7,65	H6 _{trans}
7,54			1H _{cis}	7,34	H5 _{cis}
7,52			1H _{trans}	8,03; 7,65	H4 _{trans}
7,42	Multiplete	-	1H _{cis}	7,92	H4 _{cis}
7,35			2H _{trans}	7,12	H3''-H5'' _{trans}
7,34			1H _{cis}	7,54	H6 _{cis}
7,32			2H _{cis}	6,91	H3''-H5'' _{cis}
7,14	Multiplete	-	1H _{trans}	7,35	H4'' _{trans}
7,12			1H _{cis}	7,32	H4'' _{cis}
7,06	Multiplete	-	2H _{trans}	7,35	H2''-H6'' _{trans}
7,04			2H _{trans}	7,69	H3'-H5' _{trans}
6,91	Multiplete	-	2H _{cis}	7,32	H2''-H6'' _{cis}
6,90			2H _{cis}	6,77	H3'-H5' _{cis}
6,77	Multiplete	-	2H _{cis}	6,90	H2'-H6' _{cis}

Tabela 2.15- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.b em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
198,33	C	-	7,36	$\text{C}=\text{S}_{cis}$
196,18	C	-	7,56	$\text{C}=\text{S}_{trans}$
156,46	C	-	7,35	$\text{C1}''_{trans}$
156,28	C	-	7,69; 7,04	$\text{C4}'_{trans}$
			6,90	$\text{C4}'_{cis}$
156,03	C	-	7,32	$\text{C1}''_{cis}$
145,37	C	-	7,92; 7,42; 7,34	C2_{cis}
145,00	C	-	8,03; 7,52	C2_{trans}
139,15	C	-	8,03; 7,65	C1_{trans}
136,12	C	-	7,92	C1_{cis}
133,77	CH	7,65	8,03	C5_{trans}
133,51	CH	7,54	7,92	C5_{cis}
133,02	C	-	7,69; 7,04	$\text{C1}'_{trans}$
132,61	C	-	6,90; 6,77	$\text{C1}'_{cis}$
129,88	CH	-	-	$\text{C3}''-\text{C5}''_{cis}$
129,87	CH	7,35	7,14	$\text{C3}''-\text{C5}''_{trans}$
129,79	CH	7,52	7,56	C4_{trans}
129,62	CH	7,42	-	C4_{cis}
129,04,	CH	-	-	C6_{cis}
128,96	CH	7,56	7,52	C6_{trans}
125,46	CH	7,69	-	$\text{C2}'-\text{C6}'_{trans}$
		6,90	-	$\text{C3}'-\text{C5}'_{cis}$
124,72	CH	8,03	7,65	C3_{trans}
124,59	CH	7,92	7,54	C3_{cis}
124,02	CH	7,14	7,06	$\text{C4}''_{trans}$
123,81	CH	7,12	6,91	$\text{C4}''_{cis}$
119,30	CH	7,04	-	$\text{C3}'-\text{C5}'_{trans}$
		6,91	7,12	$\text{C2}''-\text{C6}''_{cis}$
118,77	CH	7,05	7,35	$\text{C2}''-\text{C6}''_{trans}$
		6,77	-	$\text{C2}'-\text{C6}'_{cis}$

Tal como esperado, nos espectros de RMN da tiobenzanilida **4.b** também apareceram duas séries de sinais, correspondentes aos dois rotâmeros *trans* e *cis*. Pela observação do espectro de ^1H RMN verificou-se que a proporção molar entre os dois rotâmeros é de 1:0,6. Comparando os espectros das tiobenzanilidas **4.b** e **4.a** constatou-se que, tal como seria de esperar, tanto os prótons como os carbonos do anel aromático benzoílico não apresentaram alterações significativas. Nos restantes anéis aromáticos a dissemelhança observada deveu-se à substituição do grupo CH_2Ph por um grupo OPh , tal como ocorreu na benzanilida **3.b**.

Comparando os sinais de ^1H RMN e de ^{13}C RMN do rotâmero *trans* com os da respetiva benzanilida as alterações mais significativas foram observadas no espectro de carbono, nomeadamente nos carbonos C2 e C4 do anel benzoílico, os quais sofreram um deslocamento para campo mais alto surgindo a δ 145,00 ppm e 129,79 ppm, respetivamente, nos carbonos C4' e C2'-C6' do anel anilínico, que sofreram um deslocamento para campo mais baixo, aparecendo a 156,28 ppm e a 125,46 ppm, respetivamente e no carbono C1'' que surgiu a 156,46 ppm.

No que concerne aos desvios químicos de ^1H RMN do rotâmero *cis* comparativamente com os desvios químicos do rotâmero *trans* verificou-se que todos os sinais do rotâmero *cis* apareceram a campo mais alto.

No entanto os prótons H6, H2'-H6', H3'-H5' e H2''-H6'' foram os que sofreram uma blindagem maior. O próton H6 *cis* apareceu a δ 7,34 ppm, esta atribuição foi confirmada pela correlação HMBC com o carbono C=S *cis*. Os restantes prótons surgiram na forma de dois multipletos. No primeiro multipeto foram atribuídos os prótons H2''-H6'' *cis* e H3'-H5' *cis* aos sinais a δ 6,91 ppm e 6,90 ppm, respetivamente, a distinção dos prótons neste multipeto foram feitas pela análise do espetro COSY no qual os prótons H2''-H6'' acoplavam com os prótons H3''-H5'' (δ 7,32 ppm). Os prótons H2'-H6' foram atribuídos ao segundo multipeto que surgiu a δ 6,77 ppm. No espetro de ^{13}C RMN as alterações mais notórias nos sinais de carbono do rotâmero devem-se aos carbonos C2'-C6' e C3'-C5' os quais surgiram a 118,77 ppm e a 125,46 ppm, respetivamente. A Figura 2.16 apresenta as principais correlações COSY e HMBC do composto **4.b**.

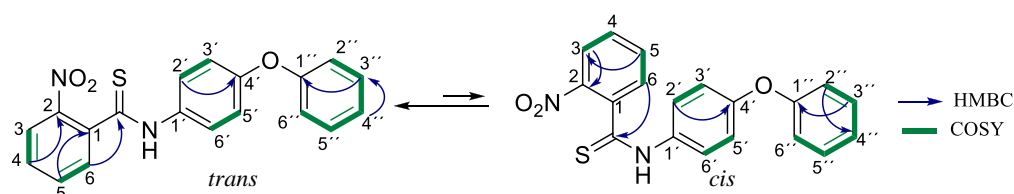


Figura 2.16- Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto **4.b**.

Analogamente à tiobenzanilida **4.a** também foram atribuídos os sinais de RMN ^1H e ^{13}C do composto **4.b** em DMSO- d_6 (Anexo 31 a Anexo 35) e como espetável o rácio entre os rotâmeros diminuiu consideravelmente (1:0,1). Nas Tabela 2.16 e Tabela 2.17 estão compiladas as atribuições dos sinais dos espetros de RMN de ^1H e de ^{13}C , respetivamente, em DMSO- d_6 .

Tabela 2.16- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto **4.b** em DMSO- d_6 .

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
12,70	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
10,40	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,20	Dupleto	8,2	1H <i>trans</i>	7,77	H3 <i>trans</i>
8,07	Dupleto	8,2	1H <i>cis</i>	7,62	H3 <i>cis</i>
8,00	Dupleto	8,9	1H <i>trans</i>	7,22	H2'-H6' <i>trans</i>
7,91	Tripleto	7,5	1H <i>trans</i>	7,74	H5 <i>trans</i>
7,77	Multipeto	-	1H <i>trans</i>	7,80	H4 <i>trans</i>
7,74			1H <i>trans</i>	7,91	H6 <i>trans</i>
7,73			1H <i>cis</i>	8,07	H5 <i>cis</i>
7,62	Tripleto	7,8	1H <i>cis</i>	8,07	H4 <i>cis</i>
7,52	Tripleto	7,6	2H <i>trans</i>	7,27; 7,16	H3''-H5'' <i>trans</i>
7,46	Tripleto	8,0	2H <i>cis</i>	7,02	H3''-H5'' <i>cis</i>
7,40	Dupleto	7,6	1H <i>cis</i>	-	H6 <i>cis</i>
7,27	Dupleto	7,4	1H <i>trans</i>	7,52	H4'' <i>trans</i>
			1H <i>cis</i>	-	H4'' <i>cis</i>
7,22	Dupleto	8,5	2H <i>trans</i>	8,00	H3'-H5' <i>trans</i>
7,16	Dupleto	7,8	2H <i>trans</i>	7,51	H2''-H6'' <i>trans</i>
7,11	Dupleto	8,8	2H <i>cis</i>	6,93	H3'-H5' <i>cis</i>
7,02	Dupleto	7,7	2H <i>cis</i>	7,46	H2''-H6'' <i>cis</i>
6,93	Dupleto	8,9	2H <i>cis</i>	7,11	H2'-H6' <i>cis</i>

Tabela 2.17- Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.b em DMSO-*d*₆.

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
196,99	C	-	7,70	C=S _{cis}
193,16	C	-	7,76	C=S _{trans}
156,54	C	-	7,52; 7,22; 7,16	C1'' _{trans}
			-	C1'' _{cis}
154,62	C	-	8,00; 7,22	C4' _{trans}
			-	C4' _{cis}
145,09	C	-	8,20; 7,74	C2 _{trans}
139,02	C	-	12,43; 8,20; 7,91	C1 _{trans}
136,98	C	-	8,07; 7,73	C2 _{cis}
134,72	C	-	8,00	C1' _{trans}
134,21	C	-	6,93	C1' _{cis}
133,95	CH	7,91	8,20	C5 _{trans}
133,83	CH	7,73	8,07	C5 _{cis}
130,16	CH	7,52	7,73; 7,52; 7,27	C3''-C5'' _{trans}
129,84	CH	7,77	7,74	C4 _{trans}
129,68	CH	7,62	7,40	C4 _{cis}
129,10	CH	7,74	7,77	C6 _{trans}
128,06	CH	7,40	-	C6 _{cis}
125,45	CH	7,11	-	C3'-C5' _{cis}
124,82	CH	8,00	12,40; 7,51	C2'-H6' _{trans}
124,60	CH	8,07	-	C3 _{cis}
124,36	CH	8,20	7,91; 7,77	C3 _{trans}
123,78	CH	7,27	7,51	C4'' _{trans}
123,68	CH	7,27	-	C4'' _{cis}
118,83	CH	6,93	-	C2'-C6' _{cis}
118,71	CH	7,22	7,27	C3'-C5' _{trans}
118,69	CH	7,16	7,52	C2''-C6'' _{trans}

A informação obtida pelo espectro de IV (Anexo 36) confirmou a estrutura do composto **4.b** (Tabela 2.18).

Tabela 2.18- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.b.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3036	Elongação C-H aromática
1588	Elongação C-C aromática
1527	Elongação NO ₂
1342	Elongação C-NO ₂
1242	Elongação C=S
1020	Elongação C-O-C
871 – 691	Torção C-H

O espectro de ESI-HRMS do composto **4.b** obtido em modo positivo, Anexo 37, permitiu verificar a existência de um pico correspondente ao pico da molécula protonada [M+H⁺] com m/z = 351,0795 (C₁₉H₁₅N₂O₃S) corroborando assim a estrutura do composto deduzida pelas análises das técnicas anteriores.

2.1.3. Síntese e caracterização de 2-nitro-*N*-(4-octilfenil)benzotioamida, 4.c

2.1.3.1. 2-Nitro-*N*-(4-octilfenil)benzoamida

A síntese do composto 2-nitro-*N*-(4-octilfenil)benzotioamida **4.c** foi realizada em dois passos reacionais, como já referido anteriormente, segundo o mesmo procedimento das sínteses dos compostos anteriores. No primeiro passo obteve-se a 2-nitro-*N*-(4-octilfenil)benzoamida **3.c** por reação entre o cloreto 2-nitrobenzoílo **1.a** e a 4-octilanilina **2.c** de acordo com o procedimento 3.3.1.3, tendo-se obtido um rendimento de 92,8%. A Figura 2.17 representa a estrutura numerada do composto **3.c**. Nas Tabela 2.19 e Tabela 2.20 estão apresentadas as atribuições dos sinais de RMN ^1H e de ^{13}C em CDCl_3 , respetivamente e os espetros podem ser consultados nos Anexo 38 a Anexo 42.

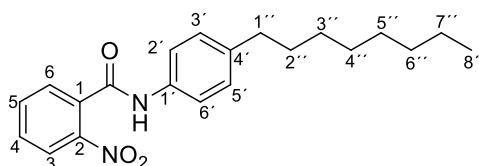


Figura 2.17- Estrutura numerada do composto 3.c.

Tabela 2.19- Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 3.c em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
8,11	Dupleto	8,1	1 <i>H</i>	7,60	H3
7,72	Tripleto	7,4	1 <i>H</i>	7,60	H5
7,63	Multiplete	-	2 <i>H</i>	-	H6
7,60				8,11; 7,72	H4
7,48	Multiplete	-	-	7,18	H2'-H6'
					NH
7,18	Dupleto	8,1	2 <i>H</i>	7,48	H3'-H5'
2,59	Tripleto	7,6	2 <i>H</i>	1,59	H1''
1,59	Multiplete	-	2 <i>H</i>	2,59; 1,27	H2''
					H3''
					H4''
1,27					H5''
					H6''
					H7''
0,88	Multiplete	-	3 <i>H</i>	1,27	H8''

Tabela 2.20- Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 3.c em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
164,23	C	-	7,63	C=O
146,31	C	-	8,11; 7,63; 7,60	C2
140,09	C	-	7,48; 2,59	C4'
134,79	C	-	7,18; 7,48	C1'
133,90	CH	7,72	8,11; 7,72	C5
132,97	C	-	8,11	C1
130,72	CH	7,60	7,63	C4
129,05	CH	7,18	7,18; 2,59	C3'-C5'
128,61	CH	7,63	7,60	C6
124,72	CH	8,11	7,72	C3
120,48	CH	7,48	7,48; 7,18	C2'-C6'
35,41	CH ₂	2,59	7,18	C1''
31,87	CH ₂	1,27	1,27; 0,88	C6''
31,51	CH ₂	1,59	2,59	C2''
29,46	CH ₂	1,27	-	C4''*
29,25	CH ₂	1,27	-	C5''*
29,23	CH ₂	1,27	2,59; 1,59	C3''
22,66	CH ₂	1,27	0,88	C7''
14,10	CH ₂	0,88	1,27	C8''

* Sinais intermutáveis

Uma vez que a única diferença entre o composto **3.a** e o **3.c** é o substituinte na posição *para* do anel aromático dissustituído, as alterações mais notórias nos espectros de RMN foram atribuídas a essa diferente substituição. Os prótons do grupo octilo aparecem como um sistema de spin a campo alto. No espectro de ¹H RMN o tripleto a δ 2,59 ppm corresponde aos prótons H1'', que estando diretamente ligados ao anel aromático são os que se encontram mais desblindados; a correlação em HMBC entre C4'' e este sinal permite a confirmação da sua atribuição. O multipletto a δ 1,59 ppm apresenta no espectro COSY uma correlação com os prótons H1'', o que permite atribuir aquele sinal aos prótons H2'', os quais, por sua vez, apresentam uma segunda correlação COSY com o multipletto centrado a 1,27 ppm. O sinal de menor desvio químico a δ 0,88 ppm, característico de grupos metilo, foi atribuído ao grupo metilo terminal apresentando também uma correlação COSY com o multipletto centrado a δ 1,27 ppm. Este multipletto deverá corresponder aos prótons H3'', H4'', H5'' e H7'', que por serem química e magneticamente muito semelhantes não aparecem como sinais individualizados. Contrariamente ao observado para os sinais dos prótons os oito carbonos da cadeia alquílica apresentam sinais separados. C1'' e C2'' aparecem a δ 35,41 ppm e 31,51 ppm como deduzido do espectro HSQC e o sinal a δ 29,23 ppm foi atribuído a C3'' uma vez que em HMBC surgiu acoplado com os prótons H1'' e H2''. O sinal de C8'' aparece a δ 14,10 ppm, significativamente blindado comparativamente com os outros carbonos devido ao chamado efeito γ-gauche, que se pensa ser uma compressão estereoquímica na posição γ devido a interações gauche ⁶¹. O sinal a δ 22,66 ppm foi atribuído a C7'', não só pelo seu desvio químico mas também porque acoplava em HMBC com os prótons H8'', estes prótons apresentavam igualmente uma correlação HMBC com o sinal a δ 31,86 ppm o que permitiu atribuir este último sinal a C6''. Os valores de desvios químicos de C4'' e C5'' não puderam ser atribuídos inequivocamente por apresentarem valores e correlações muito semelhantes. A Figura 2.18 representa as principais correlações de COSY e HMBC do composto **3.c**.

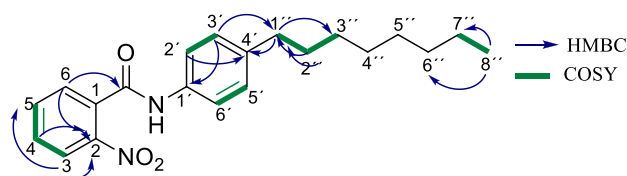


Figura 2.18- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto **3.c**.

O espectro de IV (Anexo 43) confirmou a estrutura do composto **3.c** (Tabela 2.21).

Tabela 2.21- Principais bandas de absorção de IV do composto **3.c**.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3318	Elongação N-H
2957 – 2852	Elongação C-H aromática
1646	Elongação C=O
1593	Elongação C-C aromática
1522	Elongação NO ₂
1467 – 1412	Elongação CH ₂ e CH ₃
1361	Elongação C-NO ₂
820 – 691	Torção C-H

2.1.3.2. 2-Nitro-*N*-(4-octilfenil)benzotioamida

A 2-nitro-*N*-(4-octilfenil)benzotioamida foi obtida pela reação entre a benzanilida **3.c** e o LR de acordo com o procedimento geral descrito em 3.3.2.3. Purificou-se 1,596 g da mistura reacional obtendo-se o produto pretendido com um rendimento de 12,6%. A atribuição dos sinais de RMN de ¹H e de ¹³C foram realizadas utilizando CDCl₃ como solvente, Tabela 2.22 e Tabela 2.23 (Anexo 44 a Anexo 48). A Figura 2.19 representa a estrutura numerada do composto **4.c**.

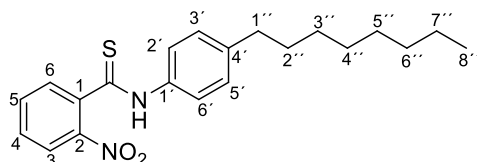


Figura 2.19- Estrutura numerada do composto **4.c**.

Tabela 2.22- Dados de RMN, ¹H e COSY do composto 4.c em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
9,72	Singuleto	-	-	-	NH _{cis}
8,93	Singuleto	-	-	-	NH _{trans}
8,04	Dupleto	8,3	1H _{trans}	7,53	H3 _{trans}
7,92	Dupleto	7,9	1H _{cis}	7,41	H3 _{cis}
7,69	Multipleteo	-	3H _{trans}	7,25	H2'-H6' _{trans}
7,66				7,53	H5 _{trans}
7,59	Dupleto	6,9	1H _{trans}	7,66	H6 _{trans}
7,53	Multipleteo	-	1H _{trans}	8,04	H4 _{trans}
			1H _{cis}	-	H5 _{cis}
7,41	Multipleteo	-	1H _{cis}	7,92	H4 _{cis}
7,37			1H _{cis}	-	H6 _{cis}
7,25	Multipleteo	-	1H _{trans}	7,66	H3'-H5' _{trans}
6,96	Dupleto	4,2	2H _{cis}	6,81	H3'-H5' _{cis}
6,81	Dupleto	8,2	2H _{cis}	6,96	H2'-H6' _{cis}
2,63	Tripleteo	7,8	2H _{trans}	1,63	H1'' _{trans}
2,47	Tripleteo	7,8	2H _{cis}	1,47	H1'' _{cis}
1,63	Multipleteo	-	2H _{trans}	2,63; 1,27	H2'' _{trans}
1,47	Multipleteo	-	2H _{cis}	2,47; 1,27	H2'' _{cis}
1,27	Multipleteo	-	10H _{trans}	1,63; 0,87	H3'', H4'', H5'', H6'', H7'' _{trans}
			10H _{cis}		H3'', H4'', H5'', H6'', H7'' _{cis}
0,87	Multipleteo	-	3H _{trans}	1,27	H8'' _{trans}
			3H _{cis}		H8'' _{cis}

Tabela 2.23- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.c em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
198,23	C	-	7,37	$\text{C}=\text{S}_{\text{cis}}$
194,96	C	-	7,59	$\text{C}=\text{S}_{\text{trans}}$
145,63	C	-	7,92; 7,41; 7,37	C2_{cis}
145,30	C	-	8,04; 7,59; 7,53	C2_{trans}
142,56	C	-	2,62	$\text{C4}'_{\text{trans}}$
142,35	C	-	6,96	$\text{C4}'_{\text{cis}}$
139,39	C	-	8,04; 7,66; 7,53	C1_{trans}
136,36	C	-	7,92	C1_{cis}
135,70	C	-	7,25	$\text{C1}'_{\text{trans}}$
135,34	C	-	6,96; 6,81	$\text{C1}'_{\text{cis}}$
133,72	CH	7,66	8,04	C5_{trans}
133,43	CH	7,73	7,92	C5_{cis}
129,75	CH	7,53	7,59	C4_{trans}
129,49	CH	7,41	7,37	C4_{cis}
129,18	CH	6,96	2,47	$\text{C3}'-\text{C5}'_{\text{cis}}$
129,05	CH	7,59	-	C6_{cis}
		7,25	2,63	$\text{C3}'-\text{C5}'_{\text{trans}}$
128,98	CH	7,37	-	C6_{trans}
124,74	CH	8,04	7,69	C3_{trans}
124,57	CH	7,97	-	C3_{cis}
123,59	CH	7,69	7,25	$\text{C2}'-\text{C6}'_{\text{trans}}$
123,53	CH	6,81	-	$\text{C2}'-\text{C6}'_{\text{cis}}$
35,62	CH_2	2,63	7,25; 1,63	$\text{C1}''_{\text{trans}}$
35,26	CH_2	2,47	6,96; 1,47	$\text{C1}''_{\text{cis}}$
31,86	CH_2	1,63	2,62; 1,27	$\text{C2}''_{\text{trans}}$
31,79	CH_2	1,47	-	$\text{C2}''_{\text{cis}}$
31,33	CH_2	1,27	0,87	$\text{C6}''_{\text{trans}}$
31,03	CH_2	1,27	0,87	$\text{C6}''_{\text{cis}}$
29,44	CH_2	1,27	1,27	$\text{C5}''_{\text{trans}}^*$
29,33	CH_2	1,27	1,27	$\text{C5}''_{\text{cis}}^*$
29,29	CH_2	1,27	1,27	$\text{C4}''_{\text{trans}}^*$
29,23	CH_2	1,27	2,63; 1,63	$\text{C3}''_{\text{trans}}$
29,18	CH_2	1,27	2,47; 1,47	$\text{C3}''_{\text{cis}}$
29,07	CH_2	1,27	1,27	$\text{C4}''_{\text{cis}}^*$
22,65	CH_2	1,27	0,87	$\text{C7}''_{\text{trans}}$
22,62	CH_2	1,27	0,87	$\text{C7}''_{\text{cis}}$
14,10	CH_3	0,87	1,27	$\text{C8}''_{\text{trans}}$
14,08	CH_3	0,87	1,27	$\text{C8}''_{\text{cis}}$

* Sinais intermutáveis.

Tal como nos compostos descritos anteriormente também a tiobenzanilida **4.c** existe em solução como uma mistura de rotâmeros *trans* e *cis* numa proporção de 1:0,7. Os sinais de próton do rotâmero *trans*, comparativamente com a benzanilida **3.c**, não sofreram deslocamentos muito notórios. Porém os sinais de carbono sofreram deslocamentos significativos, nomeadamente, os carbonos C1, C2 e C4 do anel benzoílico, que surgiram a δ 139,39 ppm, 145,30 ppm e a 129,75 ppm, respetivamente, os carbonos quaternários do anel anilínico, os quais apareceram a δ 142,56 ppm e a 135,70 ppm, respetivamente e o C2'-C6' que sofreu um desblindamento surgiu a 123,53 ppm.

No que diz respeito aos sinais de ^1H RMN do rotâmero *cis* estes aparecem mais blindados que os respectivos prótons do rotâmero *trans*, excluindo os prótons H3'' a H7'' que surgiram aproximadamente ao mesmo desvio químico. Os prótons que sofreram uma blindagem maior foram os H2'-H6' e H3'-H5' que surgiram a 6,81 ppm e a 6,96 ppm, respetivamente. Em relação aos sinais de ^{13}C RMN o carbono que sofreu um deslocamento maior foi o C1 *cis* aparecendo a 136,36 ppm, como deduzido, da correlação HMBC com o próton H3 *cis* e este carbono. Na Figura 2.20 estão representadas as estruturas das duas espécies em solução com as respetivas correlações em COSY e HMBC.

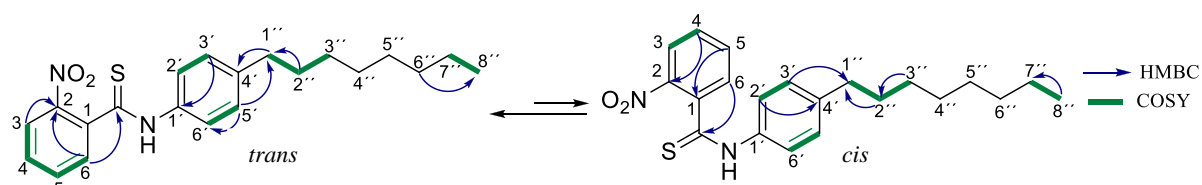


Figura 2.20- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC nos rotâmeros de 4.c.

À semelhança das tiobenzanilidas anteriores (4.a e 4.b) também foram atribuídos os sinais de RMN ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 para o composto 4.c (Tabela 2.24 e Tabela 2.25e Anexo 49 a Anexo 53). Constatou-se, novamente, que em DMSO- d_6 o rácio entre os rotâmeros *trans* e *cis* decresce acentuadamente, sendo de 1:0,1.

Tabela 2.24- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.c em DMSO- d_6 .

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
12,55	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
12,23	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,10	Dupleto	7,9	1H <i>trans</i>	7,66	H3 <i>trans</i>
7,96	Dupleto	7,9	1H <i>cis</i>	7,58	H3 <i>cis</i>
7,81	Multiplete	-	3H <i>trans</i>	7,62; 7,66	H5 <i>trans</i>
7,77				7,27	H2'-H6' <i>trans</i>
7,66	Multiplete	-	1H <i>trans</i>	7,89	H6 <i>trans</i>
7,64			1H <i>trans</i>	8,14	H4 <i>trans</i>
7,62			1H <i>cis</i>	7,50	H5 <i>cis</i>
7,58	Dupleto	7,1	1H <i>cis</i>	-	H6 <i>cis</i>
7,50	Triplete	7,9	1H <i>cis</i>	7,96	H4 <i>cis</i>
7,27	Dupleto	8,3	2H <i>trans</i>	7,81	H3'-H5' <i>trans</i>
7,01	Dupleto	8,3	2H <i>cis</i>	6,89	H2'-H6' <i>cis</i>
6,89	Dupleto	8,3	2H <i>cis</i>	7,01	H3'-H5' <i>cis</i>
2,59	Triplete	7,9	2H <i>trans</i>	1,57	H1'' <i>trans</i>
2,43	Triplete	7,5	2H <i>cis</i>	1,44	H1'' <i>cis</i>
1,57	Multiplete	-	2H <i>trans</i>	2,58; 1,24	H2'' <i>trans</i>
1,44	Multiplete	-	2H <i>cis</i>	2,43	H2'' <i>cis</i>
1,24	Multiplete	-	10H <i>trans</i>	1,57; 0,85	H3'', H4'', H5'', H6'', H7'' <i>trans</i>
			10H <i>cis</i>	0,85	H3'', H4'', H5'', H6'', H7'' <i>cis</i>
0,85	Multiplete	-	3H <i>trans</i>	1,24	H8'' <i>trans</i>
			3H <i>cis</i>		H8'' <i>cis</i>

Tabela 2.25- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.c em $\text{DMSO}-d_6$.

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
193,03	C	-	7,64	C=S <i>trans</i>
145,10	C	-	8,10; 7,64	C2 <i>trans</i>
140,90	C	-	7,77; 2,58	C4' <i>trans</i>
139,12	C	-	12,23; 8,10	C1 <i>trans</i>
137,00	C	-	7,77	C1' <i>trans</i>
133,92	CH	7,81	8,10	C5 <i>trans</i>
133,76	CH	7,62	7,88	C5 <i>cis</i>
129,77	CH	7,66	7,64	C4 <i>trans</i>
129,08	CH	7,64	7,66	C6 <i>trans</i>
128,80	CH	7,01	2,43	C3'-C5' <i>cis</i>
128,49	CH	7,27	2,58	C3'-C5' <i>trans</i>
124,33	CH	8,10	7,81	C3 <i>trans</i>
123,42	CH	6,84	7,58	C2'-C6' <i>cis</i>
122,89	CH	7,77	12,23; 7,27	C2'-C6' <i>trans</i>
34,79	CH	2,59	7,27	C1'' <i>trans</i>
		2,43	-	C1'' <i>cis</i>
31,31	CH	1,24	0,85	C6'' <i>trans</i>
31,25	CH ₂	1,24	0,85	C6'' <i>cis</i>
30,97	CH ₂	1,56	2,58	C2'' <i>trans</i>
30,66	CH ₂	1,44	2,43	C2'' <i>cis</i>
28,87	CH ₂	1,24	2,58	C4'' <i>trans</i>
28,71	CH ₂	1,24	2,58	C3'' <i>trans</i>
28,67	CH ₂	1,24	-	C5'' <i>trans</i>
22,12	CH ₂	1,24	0,85	C7'' <i>trans</i>
22,09	CH ₂	1,24	0,85	C7'' <i>cis</i>
14,00	CH ₃	0,85	1,24	C8'' <i>trans</i>
13,98	CH ₃	0,85	1,24	C8'' <i>cis</i>

As bandas apresentadas no espectro de IV (Anexo 54) corroboraram a estrutura determinada por RMN para o composto 4.c. Na Tabela 2.26 estão apresentados os principais números de onda retirados do espectro de IV.

Tabela 2.26- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.c.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3110	Elongação N-H aromática
2920 – 2849	Elongação C-H aromática
1527	Elongação C-C aromática
1508	Elongação NO ₂
1466 – 1439	Elongação CH ₃ e CH ₂
1382	Elongação C-NO ₂
1239	Elongação C=S
858 – 712	Torção C-H

Pela análise do espectro de ESI-HRMS em modo positivo do composto 4.c, Anexo 55, foi possível verificar a existência de um pico correspondente ao pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}^+]$ com $m/z = 371,1788$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$). Este valor foi mais uma confirmação da estrutura do 4.c deduzida pelas análises das técnicas anteriores.

2.1.4. Síntese e caracterização de 2-nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzotioamida, 4.d

2.1.4.1. 2-Nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzoamida

O primeiro passo reacional da síntese da 2-nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzotioamida consiste na síntese da 2-nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzoamida, **3.d**, por reação entre o cloreto 2-nitrobenzoílo **1.a** e 4'-octiloxianilina **2.d** de acordo com o procedimento geral descrito no ponto 3.3.1.4. O composto **3.d** foi obtido com um rendimento de 74,0%, a Figura 2.21 representa a estrutura numerada deste composto. O composto **3.d** foi caracterizado utilizando as mesmas técnicas de caracterização das benzanilidas anteriores. As experiências de RMN foram realizadas em CDCl₃ (Anexo 56 a Anexo 60). Nas Tabela 2.27 e Tabela 2.28 estão apresentadas as atribuições dos sinais dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, respectivamente.

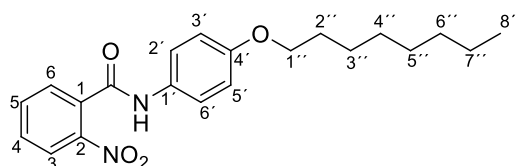


Figura 2.21- Estrutura numerada do composto 3.d.

Tabela 2.27- Dados de RMN, ¹H e COSY do composto 3.d em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
8,10	Dupleto	8,2	1H	7,61	H3
7,70	Multiplete	-	1H	7,63	H5
7,63	Multiplete	-	2H	7,70	H6
7,61				8,10	H4
7,46	Multiplete	-	2H	6,89	H2'-H6'
6,89	Dupleto	8,3	2H	7,46	H3'-H5'
3,95	Triplete	5,9	2H	1,78	H1''
1,78	Quintuplete	6,7	2H	3,95; 1,43	H2''
1,43	Multiplete	-	10H	1,32	H3''
1,36				-	H5''
1,32				1,43	H4''
1,31				-	H7''
1,30				-	H6''
0,89				1,31	H8''

Tabela 2.28- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto **3.d** em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
164,32	C	-	7,63	C=O
156,68	C	-	7,56; 6,89; 3,95	C4'
146,28	C	-	8,10; 7,63	C2
133,88	CH	7,70	8,10	C5
132,95	C	-	8,10; 7,70	C1
130,66	CH	7,60	7,63	C4
129,95	C	-	7,47; 6,89	C1'
128,64	CH	7,63	7,60	C6
124,68	CH	8,10	7,70	C3
122,46	CH	7,46	7,46	C2'-C6'
114,80	CH	6,89	6,89	C3'-C5'
68,30	CH ₂	3,95	1,78	C1''
31,80	CH ₂	1,30	0,89	C6''
29,34	CH ₂	1,36	1,32	C5''
29,22	CH ₂	1,78	3,95; 1,43	C2''
		1,32	1,43; 1,36	C4''
26,00	CH ₂	1,43	3,95; 1,78	C3''
22,64	CH ₂	1,31	0,89	C7''
14,10	CH ₂	0,89	1,31	C8''

Comparando os sinais de RMN ^1H da benzanilida **3.d** com os da benzanilida **3.c**, os prótons que sofreram maior desvio químico foram os prótons H3'-H5' e o próton H1'' da cadeia alifática. Os prótons H1'' apareceram mais blindados com um desvio químico de 3,95 ppm, enquanto os prótons H3'-H5' aparecem a cerca de 6,89 ppm significativamente mais blindados do que em **3.c**, onde aparecem a 7,18 ppm, devido ao efeito +M do oxigênio. No espectro de carbono foram visíveis alterações nos carbonos do anel aromático *para* dissustituído e nos carbonos C1'', C2'' e C3''. Os carbonos C1'' e C4' sofreram a maior desblindagem aparecendo a desvios químicos de 68,30 ppm e 156,69 ppm, respectivamente. Os carbonos C3'-C5' e C1' devido ao efeito +M do oxigênio, que coloca uma elevada densidade eletrônica nas posições *orto* e *para*, aparecem a campo mais alto do que no composto **3.c**. Os carbonos C2'-C6' sofreram uma maior desblindagem, aparecendo a 122,46 ppm, do que os carbonos respectivos do composto **3.c**, os quais apareceram a δ 120,48 ppm. Os carbonos C2'' e C3'' sofreram um deslocamento para campo mais alto aparecendo a 29,22 ppm e a 26,00 ppm. A Figura 2.22 ilustra as principais correlações existentes no COSY e no HMBC.

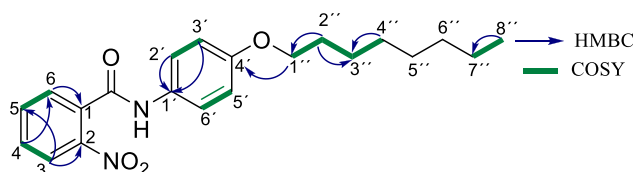


Figura 2.22- Principais correlações de COSY e HMBC do composto **3.d**.

O espectro de IV (Anexo 61) constitui mais uma confirmação sobre a estrutura do composto **3.d**. Na Tabela 2.29 estão compilados os números de onda das bandas características dos principais grupos funcionais.

Tabela 2.29- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.d.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3276	Elongação N-H
3066 – 2853	Elongação C-H aromática
1645	Elongação C=O
1596	Elongação C-C aromática
1529	Elongação NO ₂
1474	Elongação CH ₂ e CH ₃
1353	Elongação C-NO ₂
823 – 695	Torção C-H

2.1.4.2. 2-Nitro-*N*-(4-octiloxifenil)benzotioamida

Subsequentemente, sintetizou-se a 2-nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzotioamida **4.d**, Figura 2.23, de acordo com o procedimento geral do ponto 3.3.2.4. Foram purificadas 0,581 g do produto bruto tendo-se obtido o produto puro com um rendimento de 4,1%.

Nas Tabela 2.30 e Tabela 2.31 estão apresentadas as atribuições dos sinais de RMN ¹H e de ¹³C em CDCl₃, respetivamente e os espectros podem ser consultados nos Anexo 62 a Anexo 66.

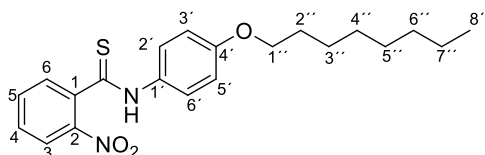


Figura 2.23- Estrutura numerada do composto 4.d.

Tabela 2.30- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.d em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
9,88	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
9,10	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,00	Dupleto	8,2	$1H_{trans}$	7,51	H3 <i>trans</i>
7,89	Dupleto	8,2	$1H_{cis}$	7,38	H3 <i>cis</i>
7,64	Tripleto	7,5	$1H_{trans}$	-	H5 <i>trans</i>
7,58	Multipleteo	-	$2H_{trans}$	6,92	H2'-H6' <i>trans</i>
7,56			$1H_{trans}$	-	H6 <i>trans</i>
7,52			$1H_{cis}$	7,32	H5 <i>cis</i>
7,51			$1H_{trans}$	8,00	H4 <i>trans</i>
7,38	Tripleto	8,8	$1H_{cis}$	7,89	H4 <i>cis</i>
7,32	Dupleto	7,7	$1H_{cis}$	7,52	H6 <i>cis</i>
6,92	Dupleto	9,0	$2H_{trans}$	7,58	H3'-H5' <i>trans</i>
6,86	Dupleto	9,0	$2H_{cis}$	6,64	H2'-H6' <i>cis</i>
6,64	Dupleto	9,0	$2H_{cis}$	6,86	H3'-H5' <i>cis</i>
3,96	Tripleto	6,6	$2H_{trans}$	1,78	H1'' <i>trans</i>
3,82	Tripleto	6,6	$2H_{cis}$	1,70	H1'' <i>cis</i>
1,78	Quintupleto	7,0	$2H_{trans}$	3,96	H2'' <i>trans</i>
1,70	Quintupleto	7,0	$2H_{cis}$	3,82	H2'' <i>cis</i>
1,46	Multipleteo	-	$2H_{trans}$	1,78	H3'' <i>trans</i>
			$2H_{cis}$	1,70	H3'' <i>cis</i>
1,29	Multipleteo	-	$8H_{trans}$	0,89	H4'', H5'', H6'', H7'' <i>trans</i>
			$8H_{cis}$	0,87	H4'', H5'', H6'', H7'' <i>cis</i>
0,89	Multipleteo	-	$3H_{trans}$	1,29	H8'' <i>trans</i>
0,87			$3H_{cis}$		H8'' <i>cis</i>

Tabela 2.31- Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.d em CDCl₃.

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
198,27	C	-	7,32	C=S _{cis}
196,05	C	-	7,56	C=S _{trans}
158,11	C	-	6,92; 7,58; 3,96	C4' _{trans}
158,09			6,64; 3,82	C4' _{cis}
145,24	C	-	7,89; 7,28; 7,32	C2 _{cis}
145,01	C	-	8,00; 7,56; 7,51	C2 _{trans}
139,15	C	-	8,00; 7,64	C1 _{trans}
136,29	C	-	7,89; 7,52	C1 _{cis}
133,69	CH	7,64	8,00	C5 _{trans}
133,40	CH	7,52	7,89	C5 _{cis}
130,79	C	-	7,58; 6,92	C1' _{trans}
130,50	C	-	6,64	C1' _{cis}
129,65	CH	7,51	7,56	C4 _{trans}
129,38	CH	7,38	7,32	C4 _{cis}
129,02	CH	7,32	7,38	C6 _{cis}
128,95	CH	7,56	7,51	C6 _{trans}
125,54	CH	7,58	7,58	C2'-C6' _{trans}
125,51	CH	6,86	6,86	C2'-C6' _{cis}
124,65	CH	8,00	7,64	C3 _{trans}
124,52	CH	7,89	7,52	C3 _{cis}
114,79	CH	6,92	6,92	C3'-C5' _{trans}
114,74	CH	6,64	6,64	C3'-C5' _{cis}
68,24	CH ₂	3,96	1,78	C1'' _{trans}
68,17	CH ₂	3,82	1,70	C1'' _{cis}
31,77	CH ₂	1,29	1,29; 0,89	C6'' _{trans}
31,72	CH ₂	1,29	1,29; 0,87	C6'' _{cis}
29,31	CH ₂	1,29	1,29	C5'' _{trans}
29,25	CH ₂	1,29	1,29	C5'' _{cis}
29,20	CH ₂	1,29	1,29	C4'' _{trans}
29,16	CH ₂	1,29	1,29	C4'' _{cis}
29,13	CH ₂	1,78	3,96	C2'' _{trans}
29,03	CH ₂	1,70	3,82	C2'' _{cis}
25,98	CH ₂	1,46	3,96; 1,78	C3'' _{trans}
25,89	CH ₂	1,37	3,82; 1,70	C3'' _{cis}
22,62	CH ₂	1,29	0,89	C7'' _{trans}
22,58	CH ₂	1,29	0,87	C7'' _{cis}
14,08	CH ₃	0,89	1,29	C8'' _{trans}
14,05	CH ₃	0,87	1,29	C8'' _{cis}

Pela análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C em CDCl₃ é possível verificar, à semelhança do que acontece para as outras tiobenzanilidas, a existência de equilíbrio conformacional em estado líquido entre os rotâmeros *trans* e *cis* numa proporção de 1:0,6.

Comparando os espectros da tiobenzanilida **4.d** com os da benzanilida **3.d** constatou-se que os sinais de ¹H RMN do rotâmero *trans* não sofreram alterações significativas com a mudança de C=O para C=S. Porém no espectro de ¹³C RMN, tal como esperado, as alterações mais significativas observam-se nos carbonos C1, C2 e C4 do anel benzofílico e nos carbonos C1', C2'-C6' e C4' do anel anilínico.

Os carbonos C1, C2 e C4 surgiram a δ 139,15 ppm, 145,01 ppm e 129,65 ppm, respectivamente. Foi possível distinguir os sinais dos carbonos C1 e C2 pela análise do espectro HMBC pois existia uma correlação entre o carbono C1 e os prótons H3 e H5 enquanto o carbono C2 correlacionava-se com os prótons H3, H6 e H4. Quanto ao carbono C4, este correlacionava-se com o próton H6. Os carbonos C2'-C6' do anel anilínico surgiram a δ 125,54 ppm e os carbonos quaternários deste anel aromático surgiram a δ 158,10 ppm e 130,79 ppm tendo sido atribuídos ao C4' e C1', respectivamente.

Relativamente às diferenças entre os sinais de ^1H RMN do rotâmero *trans* e *cis* verificou-se que os prótons do rotâmero *cis* surgem a campo mais alto, sendo H6, H2'-H6' e H3'-H5' os que sofreram maior blindagem. O próton H6 surgiu a δ 7,32 ppm acoplado com o próton H5 no espectro COSY. Os prótons H2'-H6' e H3'-H5' foram atribuídos aos sinais 6,86 ppm e a 6,64 ppm, respectivamente, havendo uma correlação entre estes prótons no espectro COSY. No espectro de carbono apenas o C1 *cis* apresentou uma maior variação comparativamente com o sinal do C1 *trans*, surgindo a δ 136,29 ppm. Este sinal foi atribuído ao C1 devido às correlações no espectro HMBC com os prótons H3 e H5 do rotâmero *cis*. A Figura 2.24 ilustra as principais correlações COSY e HMBC.

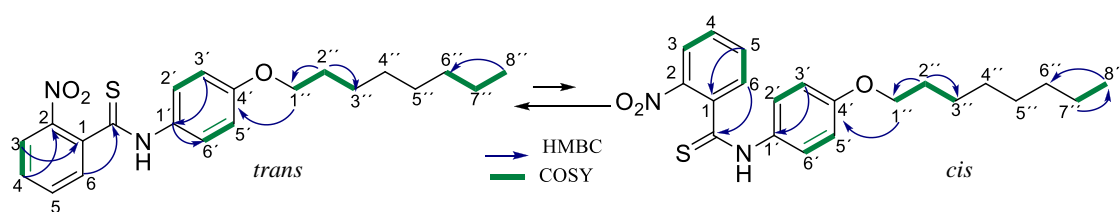


Figura 2.24- Principais correlações detectadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 4.d.

A atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C (Anexo 67 a Anexo 71) da tiobenzanilida **4.d** em $\text{DMSO-}d_6$ permitiu confirmar novamente que neste solvente o equilíbrio conformacional aparece com um rácio menor, neste caso de 1:0,1 (Tabela 2.32 e Tabela 2.33).

Tabela 2.32- Dados de RMN, ¹H e COSY do composto 4.d em DMSO-*d*₆.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
12,45	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
12,15	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,09	Dupleto	8,2	1 <i>H</i> <i>trans</i>	7,66	H3 <i>trans</i>
7,95	Dupleto	7,6	1 <i>H</i> <i>cis</i>	7,49	H3 <i>cis</i>
7,80	Multipleteo	-	3 <i>H</i> <i>trans</i>	7,62	H5 <i>trans</i>
7,77				6,70	H2'-H6' <i>trans</i>
7,66	Multipleteo	-	1 <i>H</i> <i>trans</i>	8,09	H4 <i>trans</i>
7,62			1 <i>H</i> <i>trans</i>	7,80	H6 <i>trans</i>
7,61			1 <i>H</i> <i>cis</i>	7,49	H5 <i>cis</i>
7,49	Tripleteo	7,2	1 <i>H</i> <i>cis</i>	7,61	H4 <i>cis</i>
7,27	Dupleto	7,7	1 <i>H</i> <i>cis</i>	7,61	H6 <i>cis</i>
6,99	Dupleto	9,0	2 <i>H</i> <i>trans</i>	7,77	H3'-H5' <i>trans</i>
6,93	Dupleto	8,9	2 <i>H</i> <i>cis</i>	6,74	H2'-H6' <i>cis</i>
6,74	Dupleto	9,0	2 <i>H</i> <i>cis</i>	6,93	H3'-H5' <i>cis</i>
3,98	Tripleteo	6,5	2 <i>H</i> <i>trans</i>	1,72	H1'' <i>trans</i>
3,83	Tripleteo	6,5	2 <i>H</i> <i>cis</i>	1,62	H1'' <i>cis</i>
1,72	Quintupleto	6,9	2 <i>H</i> <i>trans</i>	3,98; 1,41	H2'' <i>trans</i>
1,62	Quintupleto	6,9	2 <i>H</i> <i>cis</i>	3,83	H2'' <i>cis</i>
1,41	Multipleteo	-	2 <i>H</i> <i>trans</i>	1,72; 130 – 1,27	H3'' <i>trans</i>
1,30 – 1,27			Multipleteo	-	2 <i>H</i> <i>cis</i>
	8 <i>H</i> <i>trans</i>	0,86; 1,41			H4'', H5'', H6'', H7'' <i>trans</i>
	8 <i>H</i> <i>cis</i>				H4'', H5'', H6'', H7'' <i>cis</i>
0,86	Multipleteo	-	3 <i>H</i> <i>trans</i> 3 <i>H</i> <i>cis</i>	1,30 – 1,27	H8'' <i>trans</i> H8'' <i>cis</i>

Tabela 2.33-Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.d em DMSO-d₆.

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
196,54	C	-	-	C=S _{cis}
192,47	C	-	7,62	C=S _{trans}
156,97	C	-	6,93; 3,83	C4' _{cis}
156,89	C	-	7,78; 6,99; 3,93	C4' _{trans}
145,61	C	-	-	C2 _{cis}
145,14	C	-	8,09; 7,67; 7,62	C2 _{trans}
139,06	C	-	12,15; 8,09; 7,80	C1 _{trans}
137,14	C	-	12,45	C1 _{cis}
133,85	CH	7,80	8,09	C5 _{trans}
133,72	CH	7,61	7,95	C5 _{cis}
132,17	C	-	7,77; 6,99	C1' _{trans}
131,70	C	-	6,74	C1' _{cis}
129,70	CH	7,66	7,62	C4 _{trans}
129,47	CH	7,49	-	C4 _{cis}
129,06	CH	7,61	7,66	C6 _{trans}
128,07	CH	7,27	-	C6 _{cis}
125,16	CH	6,93	-	C2'-C6' _{cis}
124,50	CH	7,77	12,15; 7,77	C2'-C6' _{trans}
		7,95	-	C3 _{cis}
124,28	CH	8,09	-	C3 _{trans}
114,54	CH	6,74	6,74	C3'-C5' _{cis}
114,28	CH	6,99	6,99	C3'-C5' _{trans}
67,66	CH ₂	3,98	1,72; 1,41	C1'' _{trans}
67,55	CH ₂	3,83	1,62	C1'' _{cis}
31,26	CH ₂	130 – 1,27	1,30 – 1,27; 0,86	C6'' _{trans}
31,22	CH ₂	130 – 1,27	1,30 – 1,27; 0,86	C6'' _{cis}
28,76	CH ₂	130 – 1,27	1,41	C5'' _{trans} *
			-	C5'' _{cis} *
28,70	CH ₂	130 – 1,27	1,41	C4'' _{trans} *
			-	C4'' _{cis} *
28,66	CH ₂	1,72	3,93	C2'' _{trans}
28,57	CH ₂	1,62	3,83	C2'' _{cis}
25,54	CH ₂	1,41	3,93; 1,72	C3'' _{trans}
25,46	CH ₂	130 – 1,27	1,62	C3'' _{cis}
22,11	CH ₂	130 – 1,27	0,86	C7'' _{trans}
22,08	CH ₂	130 – 1,27	0,86	C7'' _{cis}
13,98	CH ₃	0,86	130 – 1,27	C8'' _{trans}
				C8'' _{cis}

* - Sinais Intermutáveis

As bandas apresentadas no espectro de IV (Anexo 72) corroboraram a estrutura determinada por RMN para o composto **4.d**. Na Tabela 2.34 estão apresentados os principais números de onda retirados do espectro de IV.

Tabela 2.34- Principais bandas de absorção de IV do composto 4.d.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3115	Elongação N-H
2921 – 2855	Elongação C-H aromática
1573	Elongação C-C aromática
1528	Elongação NO ₂
1468 – 1440	Elongação CH ₂ e CH ₃
1388	Elongação C-NO ₂
1245	Elongação C=S
831 – 728	Torção C-H

O pico presente no espectro de ESI-HRMS obtido em modo positivo do composto **4.d**, Anexo 73, correspondente ao pico da molécula protonada [M+H⁺] com m/z = 387,1732 (C₂₁H₂₇N₂O₃S) está de acordo com a estrutura proposta para o composto **4.d**.

2.1.5. Síntese e caracterização de 2-nitro-*N*-fenilbenzotioamida, 4.e

2.1.5.1. 2-Nitro-*N*-fenilbenzoamida

O primeiro passo reacional para a síntese da 2-nitro-*N*-fenilbenzotioamida deu-se por reação entre o cloreto 2-nitrobenzoílo **1.a** e a anilina **2.e** originando a 2-nitro-*N*-fenilbenzoamida, de acordo com o procedimento geral descrito no ponto 3.3.1.5. O composto **3.e** foi obtido com um rendimento de 47,0%, a Figura 2.25 representa a estrutura do composto numerado **3.e**.

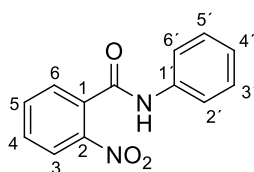


Figura 2.25- Estrutura do composto numerado 3.e.

A atribuição dos sinais de RMN ¹H e ¹³C (Anexo 74, a Anexo 78) foram feitos em CD₃OD pois não se conseguiu dissolver esta benzanilida em CDCl₃ (Tabela 2.35 e Tabela 2.36).

Tabela 2.35- Dados de RMN, ¹H e COSY do composto 3.e em CD₃OD.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
10,51	Singuleto	-	-	-	NH
8,18	Dupleto	8,2	1H	7,74	H3
7,84	Tripleto	7,5	1H	7,71	H5
7,74	Multiplete	-	2H	8,18	H4
7,71				7,84	H6
7,62	Dupleto	7,6	2H	7,37	H2'-H6'
7,37	Multiplete	-	2H	7,62; 7,17	H3'-H5'
7,17	Tripleto	7,5	1H	7,37	H4'

Tabela 2.36- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.e em CD_3OD .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
167,87	C	-	7,71	C=O
147,90	C	-	8,11; 7,74; 7,71	C2
139,63	C	-	7,62; 7,37	C1'
135,24	CH	7,84	8,18	C5
134,27	C	-	8,18; 7,84	C1
131,96	CH	7,74	7,71	C4
130,13	CH	7,71	7,74	C6
129,95	CH	7,37	7,62; 7,37; 7,17	C3'-C5'
125,88	CH	7,17	7,62	C4'
125,59	CH	8,18	7,84	C3
121,65	CH	7,62	7,62; 7,37; 7,17	C2'-C6'

O composto **3.e** não se encontra substituído na posição 4', e portanto as diferenças mais notórias nos desvios químicos nos espectros de RMN surgem no aparecimento de um CH correspondente a C4'. O próton H4' surgiu a 7,17 ppm acoplando com os prótons H3'-H5' no espectro COSY. Comparando os espectros das benzanilidas é possível verificar que a substituição do grupo anilínico na posição *para* não influencia os desvios químicos de próton e de carbono do anel benzofílico, apesar de, por questões de solubilidade, os espectros terem sido realizados noutro solvente. A Figura 2.26 apresenta as principais correlações nos espectros de COSY e HMBC.

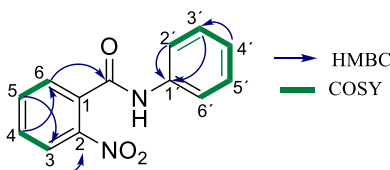


Figura 2.26- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 3.e.

A informação obtida pelo espectro de IV (Anexo 79) confirmou a estrutura do composto **3.e** (Tabela 2.37).

Tabela 2.37- Principais bandas de absorção de IV do composto 3.e.

ν (cm^{-1})	Atribuição
3252	Elongação N-H
3193 – 3039	Elongação C-H aromática
1656	Elongação C=O
1598	Elongação C-C aromática
1529	Elongação NO_2
1486	Elongação C-N
1346	Elongação C- NO_2
888 – 699	Torção C-H

2.1.5.2. 2-Nitro-N-fenilbenzotioamida

Uma vez obtida a benzanilida **3.e** foi possível convertê-la na 2-nitro-*N*-fenilbenzotioamida **4.e** de acordo com o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2.5. Foram purificados 0,500 g de produto bruto obtendo-se o produto puro com um rendimento de 14,8%, a Figura 2.27 representa a estrutura do composto numerado **4.e**.

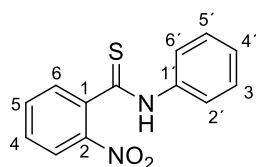


Figura 2.27- Estrutura do composto numerado 4.e.

A caracterização de RMN da tiobenzanilida **4.e** foi realizada em CDCl_3 uma vez que pela introdução do enxofre a solubilidade neste solvente aumentou comparativamente com a benzanilida correspondente, **3.e** (Anexo 80 a Anexo 84). Tal como para as outras tiobenzanilidas, o composto **4.e** também apresentou em solução um equilíbrio conformacional com um rácio de 1:0,7. Assim é possível constatar que o substituinte na posição 4' do anel aromático dissustituído na posição *para* não influencia o equilíbrio entre os rotâmeros *trans* e *cis*.

Nas Tabela 2.38 e Tabela 2.39 estão compiladas as atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , respetivamente em CDCl_3 .

Tabela 2.38- Dados de RMN, ^1H e COSY do composto 4.e em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
9,80	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
8,96	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,05	Dupleto	8,2	1H <i>trans</i>	7,54	H3 <i>trans</i>
7,92	Dupleto	8,4	1H <i>cis</i>	7,52	H3 <i>cis</i>
7,76	Dupleto	7,5	2H <i>trans</i>	7,44	H2'-H6' <i>trans</i>
7,68	Tripleto	7,5	1H <i>trans</i>	7,60	H5 <i>trans</i>
7,60	Dupleto	7,6	1H <i>trans</i>	7,68	H6 <i>trans</i>
7,54	Multipleteo	-	1H <i>trans</i>	8,05	H4 <i>trans</i>
7,52			1H <i>cis</i>	7,92	H5 <i>cis</i>
7,44	Multipleteo	-	1H <i>cis</i>	7,36	H6 <i>cis</i>
7,41			2H <i>trans</i>	7,76	H3'-H5' <i>trans</i>
7,36	Multipleteo	-	1H <i>cis</i>	7,52	H4 <i>cis</i>
7,33			1H <i>trans</i>	7,44	H4' <i>trans</i>
7,16	Multipleteo	-	2H <i>cis</i>	6,92	H3'-H5' <i>cis</i>
7,14			1H <i>cis</i>	-	H4' <i>cis</i>
6,92	Multipleteo	-	2H <i>cis</i>	7,16	H2'-H6' <i>cis</i>

Tabela 2.39- Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto **4.e** em CDCl_3 .

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
198,44	C	-	7,36	$\text{C}=\text{S}_{cis}$
195,30	C	-	7,60	$\text{C}=\text{S}_{trans}$
145,68	C	-	7,92; 7,41; 7,36	$\text{C}2_{cis}$
145,13	C	-	8,05; 7,60; 7,54	$\text{C}2_{trans}$
139,34	C	-	8,05; 7,68	$\text{C}1_{trans}$
138,05	C	-	7,76	$\text{C}1'_{trans}$
137,69	C	-	7,14	$\text{C}1'_{cis}$
136,27	C	-	7,92; 7,52	$\text{C}1_{cis}$
133,76	CH	7,68	8,05	$\text{C}5_{trans}$
133,47	CH	7,52	7,92; 7,36	$\text{C}5_{cis}$
129,81	CH	7,54	7,60	$\text{C}4_{trans}$
129,60	CH	7,16	-	$\text{C}3'-\text{C}5'_{cis}$
129,34	CH	7,44	7,16; 7,44	$\text{C}3'-\text{C}5'_{trans}$
129,17	CH	7,60	-	$\text{C}6_{trans}$
128,98	CH	7,36	7,52	$\text{C}4_{cis}$
128,95	CH	7,41	-	$\text{C}6_{cis}$
127,50	CH	7,33	7,76	$\text{C}4'_{trans}$
127,27	CH	7,14	6,92	$\text{C}4'_{cis}$
124,76	CH	8,05	7,68	$\text{C}3_{trans}$
124,63	CH	7,92	7,52	$\text{C}3_{cis}$
123,76	CH	7,76	7,76; 7,33	$\text{C}2'-\text{C}6'_{trans}$
123,64	CH	6,92	7,33; 7,14	$\text{C}2'-\text{C}6'_{cis}$

As diferenças observadas no espectro de ^1H RMN do composto **4.e** comparativamente ao espectro de ^1H RMN do composto **3.e** devem-se maioritariamente ao facto de se terem usado solventes diferentes. Relativamente ao rotâmero *cis* observou-se, como era esperado, diferenças tanto no espectro de ^1H RMN e de ^{13}C RMN comparativamente com os sinais do rotâmero *trans*. Os sinais dos prótons $\text{H}2'-\text{H}6'_{cis}$ foram os que se sofreram um deslocamento maior aparecendo a δ 6,92 ppm. No que concerne aos sinais de carbono, os sinais dos carbonos C1 e C4 foram os que sofreram o maior desvio aparecendo a 136,27 ppm e a 128,98 ppm. A Figura 2.28 ilustra as principais correlações COSY e HMBC, correspondentes a cada rotâmero.

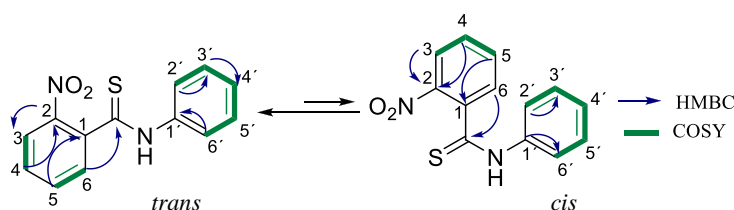


Figura 2.28- Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC nos rotâmeros do composto **4.e**.

Tal como aconteceu com as tiobenzanilidas anteriores, também se caracterizou o composto **4.e** em $\text{DMSO}-d_6$ (Anexo 85 a Anexo 89), e mais uma vez foi possível verificar que a proporção entre os rotâmeros é de 1:0,1. Nas Tabela 2.40 e Tabela 2.41 estão compilados os valores de desvio químicos e as atribuições feitas em $\text{DMSO}-d_6$.

Tabela 2.40- Dados de RMN, ¹H e COSY do composto 4.e em DMSO-*d*₆.

Desvio (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	COSY	Atribuição
12,64	Singuleto	-	-	-	NH <i>cis</i>
12,30	Singuleto	-	-	-	NH <i>trans</i>
8,10	Dupleto	8,2	1H <i>trans</i>	7,68	H3 <i>trans</i>
7,97	Dupleto	7,3	1H <i>cis</i>	7,53	H3 <i>cis</i>
7,88	Dupleto	7,6	2H <i>trans</i>	7,47	H2'-H6' <i>trans</i>
7,81	Tripleto	7,8	1H <i>trans</i>	7,65	H5 <i>trans</i>
7,68	Multipleteo	-	1H <i>trans</i>	8,10	H4 <i>trans</i>
7,65			1H <i>trans</i>	7,81	H6 <i>trans</i>
7,60	Multipleteo	-	1H <i>cis</i>	7,27	H5 <i>cis</i>
7,53	Multipleteo	-	1H <i>cis</i>	7,97	H4 <i>cis</i>
7,47	Multipleteo	-	2H <i>trans</i>	7,88; 7,31	H3'-H5' <i>trans</i>
7,31	Multipleteo	-	1H <i>trans</i>	7,88; 7,47	H4' <i>trans</i>
7,27			1H <i>cis</i>	7,60	H6 <i>cis</i>
7,22			2H <i>cis</i>	7,00	H3'-H5' <i>cis</i>
7,13	Tripleto	7,3	1H <i>cis</i>	6,91	H4' <i>cis</i>
7,00	Multipleteo	-	2H <i>cis</i>	7,05	H2'-H6' <i>cis</i>

Tabela 2.41- Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.e em DMSO-*d*₆.

Desvio (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
196,13	C	-	7,27	C=S <i>cis</i>
193,60	C	-	7,65	C=S <i>trans</i>
145,06	C	-	8,10; 7,81	C2 <i>trans</i>
139,23	C	-	8,10; 7,81; 7; 67	C1 <i>trans</i>
139,08	C	-	7,47	C1' <i>trans</i>
138,76	C	-	7,22	C1' <i>cis</i>
137,10	C	-	7,60	C1 <i>cis</i>
133,94	CH	7,81	8,10	C5 <i>trans</i>
133,79	CH	7,60	7,97; 7,60	C5 <i>cis</i>
129,81	CH	7,67	7,64	C4 <i>trans</i>
129,64	CH	7,53	7,60	C4 <i>cis</i>
129,08	CH	7,65	7,67	C6 <i>trans</i>
129,04	CH	7,22	-	C3'-C5' <i>cis</i>
128,76	CH	7,47	-	C3'-C5' <i>trans</i>
127,92	CH	7,27	-	C6 <i>cis</i>
126,60	CH	7,31	7,88	C4' <i>trans</i>
126,46	CH	7,13	7,00	C4' <i>cis</i>
124,61	CH	7,97	7,60	C3 <i>cis</i>
124,33	CH	8,10	-	C3 <i>trans</i>
123,52	CH	7,00	-	C2'-C6' <i>cis</i>
123,03	CH	7,88	12,30; 7,31	C2'-C6' <i>trans</i>

Na Tabela 2.42 estão apresentados os números de onda obtidos pela análise do espectro de IV (Anexo 90).

Tabela 2.42- Valores dos números de onda retirados do espectro de IV do composto 4.e.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3252	Elongação N-H
3193 – 3039	Elongação C-H aromática
1656	Elongação C=O
1598	Elongação C-C aromática
1529	Elongação NO ₂
1486	Elongação C-N
1346	Elongação C-NO ₂
888 – 699	Torção C-H

No espectro ESI-HRMS do composto **4.e** obtido em modo positivo, Anexo 91, verificou-se a existência de um pico correspondente ao pico da molécula protonada [M+H⁺] com m/z = 259,0529 (C₁₃H₁₁N₂O₂S), corroborando a estrutura do composto **4.e**.

2.2. Estudo do efeito do solvente no equilíbrio conformacional *trans/cis*

Como descrito anteriormente o fenómeno do equilíbrio conformacional só foi observado para as tiobenzanilidas, e nunca para as correspondentes benzanilidas, pelo que a presença do átomo de enxofre parece ser essencial para desencadear este processo. No entanto, por si só não basta para justificar a alta estabilidade dos dois rotâmeros em CDCl₃ uma vez que em trabalhos anteriores tinham sido sintetizadas tiobenzanilidas muito semelhantes, sem que este fenómeno fosse tão marcado.

Assim, para investigar o efeito das variações estruturais no equilíbrio *cis/trans* entre os rotâmeros das tiobenzanilidas, compararam-se os espectros de RMN ¹H, em CDCl₃ à temperatura ambiente, de vários compostos com diferentes substituições no anel benzoílico: 2-CF₃, 2-NO₂ e sem nenhum substituinte. A análise dos espectros de RMN permitiu verificar que este equilíbrio conformacional era fortemente dependente da posição e da natureza do substituinte do anel benzoílico, sendo a natureza do grupo substituinte em 4' irrelevante para o processo. A Figura 2.29 compila os diferentes grupos modificados (R₁ e R₂) das tiobenzanilidas e os respectivos equilíbrio *trans/cis*, os espectros sobrepostos podem ser consultados em Anexo 132.

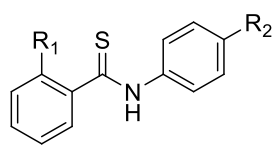
	Composto	R ₁	R ₂	<i>trans/cis</i>
	4.b	NO ₂	OPh	1: 0,6
	4.c	NO ₂	(CH ₂) ₇ CH ₃	1: 0,7
	4.e	NO ₂	H	1: 0,7
	4.f	CF ₃	(CH ₂) ₇ CH ₃	1: 0,1
	4.h	CF ₃	H	1: 0,1
	4.j	H	OPh	—

Figura 2.29- Modificações estruturais das tiobenzanilidas e respectivos rácios *trans/ cis* em CDCl₃ a 25°C.

Pela análise dos valores dos rácios é possível constatar que o impedimento estereoquímico dos substituintes na posição *orto* relativamente ao grupo tioamida influencia a proporção relativa dos rotâmeros, pois observou-se este equilíbrio rotacional quando a posição 2 deste anel aromático estava substituída com um grupo NO₂ ou CF₃, não se verificando este equilíbrio quando a posição 2 não tinha nenhum substituinte. Porém este equilíbrio foi mais notório quando se substituiu a posição 2 com o grupo NO₂.

Na tentativa de perceber qual a influência do solvente no equilíbrio conformacional, uma vez que nos compostos estudados apenas em CDCl₃, se observava o fenómeno tão marcadamente, realizaram-se espectros de RMN ¹H do composto **4.a** à temperatura ambiente em vários solventes com diferentes propriedades físico-químicas nomeadamente polaridade e número de doadores e aceptadores

de hidrogénio: CDCl_3 , C_6D_6 , $\text{DMSO}-d_6$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ e $\text{THF}-d_8$. Verificou-se que quanto mais grupos aceitadores de hidrogénio o solvente apresentava ($\text{THF}-d_8$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ e o $\text{DMSO}-d_6$) maior a proporção do *trans*, mais estável. Quando se utilizou CDCl_3 ou C_6D_6 , solventes que não tem grupos aceitadores de hidrogénio, o equilíbrio *cis/trans* foi muito mais marcado, com uma proporção significativa do conformero *cis*. A Tabela 2.43 apresenta os rácios *trans/cis*, os espetros sobrepostos podem ser consultados no Anexo 133.

Tabela 2.43- Rácio *trans/cis* do composto 4.a em vários solventes a 25°C.

Solvente Deuterado	<i>trans/cis</i>
CDCl_3	1: 0,6
C_6D_6	1: 0,4
$\text{THF}-d_8$	1: 0,1
$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	1: 0,1
$\text{DMSO}-d_6$	1: 0,1

A variação dos rácios dos rotâmeros em diferentes solventes pode estar associada a fatores como a energia de Gibbs, entalpias de solvatação ou a momentos dipolares dos compostos. Segundo a literatura ⁶² sabe-se ainda que solventes com momentos dipolares mais elevados (por exemplo $\text{DMSO}-d_6$) provocam um aumento da barreira rotacional impedindo assim a rotação da ligação C(=S)-N logo o rotâmero *cis* surge em maior quantidade ³³.

2.3. Ensaio citotóxicos em células tumorais

Os ensaios citotóxicos *in vitro* são muito utilizados para estudar a toxicidade de compostos pretendidos frente a um determinado alvo, que pode ser um organismo no seu todo ou uma parte desse organismo, como um órgão ou células ⁶³. Neste trabalho pretendeu-se observar o potencial anticancerígeno de derivados da tiobenzanilida através da observação da diminuição da viabilidade celular nas linhas celulares humanas cancerígenas A375 e MCF-7, usando o ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Neste trabalho, escolheu-se este ensaio de entre os vários possíveis com base na redução de tetrazólios, como MTS, XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazólio de sódio) e o WST-1 (5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2-tetrazólio de sódio), não só por possibilitar a obtenção de resultados preliminares fiáveis a baixo custo e tempo reduzido, como também por ser um ensaio versátil na medida em que pode ser usado com qualquer tipo de compostos e em vários tipos de linhas celulares ⁶⁴.

O MTT é um sal solúvel em água que penetra nas células viáveis convertendo-se num precipitado roxo insolúvel de formazan ((*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan) ^{63,65}, sendo portanto, a quantidade de formazan formado no meio de cultura celular proporcional ao número de células vivas ⁶⁶. Ao longo dos tempos foram propostos vários mecanismos de redução deste tetrazólio. O primeiro foi descrito por Mosmann em 1983 ⁶⁷ o qual considerou que o MTT era reduzido pela atividade das desidrogenases mitocondriais nas células viáveis, em particular através da ação do succinato desidrogenase ⁶⁵. Mais tarde o grupo de investigação de Nikkhad (1992) ⁶⁸ e o grupo de Shearman (1995) ⁶⁹ descobriram que o MTT se depositava no interior da célula predominantemente na zona perinuclear com uma forma granular. No entanto, Berridge e Tan ⁷⁰ em 1993 propuseram um mecanismo onde o NADH e o NADPH eram redutores do MTT ⁷¹. Hoje em dia, ainda não é conhecido o mecanismo exato desta reação de redução, porém, sabe-se que pode ser catalisada por vários redutores sendo os de maior importância as redutases intracelulares ⁶⁶, Figura 2.30.

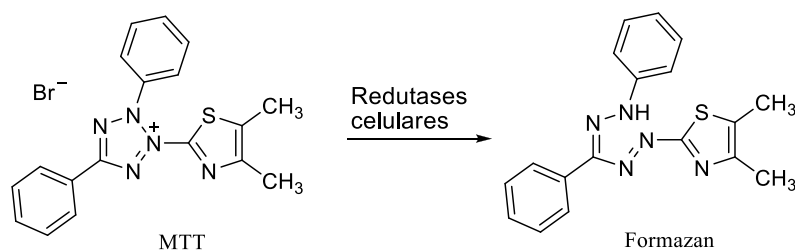


Figura 2.30- Reação de conversão do MTT em formazan, adaptado de ⁶³.

Os ensaios de toxicidade desenvolvidos nesta fase do trabalho apresentado permitiram obter informação primordial sobre a potencialidade dos compostos sintetizados como agentes anticancerígenos, e também se forneceram indicações importantes sobre as particularidades estruturais das tiobenzanilidas que podem influenciar o seu efeito citotóxico.

Os resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade realizados com os derivados da tiobenzanilida sintetizados foram expressos em curvas dose-resposta, as quais correlacionam as concentrações dos compostos com o seu efeito biológico num determinado alvo; neste caso avaliou-se a percentagem de morte celular após 24 horas em contacto com os compostos. Por interpolação dos resultados foi possível quantificar os resultados em termos de EC50 (nomenclatura seguida pelo Comité de União Internacional de Farmacologia ⁷²) que é definido como a concentração molar de um composto que é necessária para inibir 50% da viabilidade da população, ou seja 50% da morte celular. Além do valor de EC50 foram também retirados das curvas dose-resposta parâmetros importantes como os limites mínimo e máximo e o declive ⁷³. O limite mínimo corresponde à concentração mínima de composto necessária para se verificar morte celular (superior a 0%). Por sua vez o limite máximo é a concentração mínima de composto à qual se observa a toxicidade máxima, que neste caso corresponde ao máximo de morte celular atingida no ensaio, ou seja traduz a eficiência dos compostos estudados. O declive é um parâmetro que relaciona variações na concentração da dose administrada com os efeitos que provocam nas respostas biológicas ⁷³. As curvas que tenham maiores declives dizem-se curvas acentuadas, o que significa que uma ligeira variação da concentração do composto origina uma grande alteração da resposta biológica (morte celular), enquanto declives suaves são indicativos de que pequenas variações na concentração não provocam grandes alterações na resposta biológica. O declive das curvas dose-resposta está portanto associado à potência dos compostos em estudo ⁷³.

2.3.1. Células do melanoma maligno da pele (A375)

Os compostos foram testados de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.5. Após a incubação das microplacas que continham composto e controlos, verificou-se alterações nas intensidades das cores nos poços das microplacas, estando estas alterações relacionadas com o número de células viáveis. Uma coloração mais escura é indicativa da presença de maior quantidade de formazan e, portanto, de uma maior quantidade de células viáveis. A Figura 2.31 ilustra uma microplaca de ensaio em células A375 após incubação com a doxorrubicina e dissolução dos cristais de formazan em metanol e a Figura 2.32 representa uma imagem das células da linha A375 ao microscópio óptico.

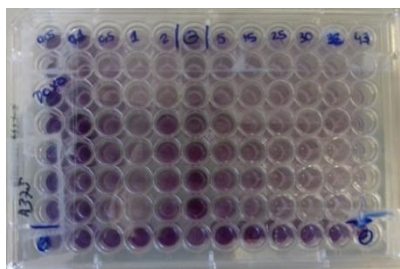


Figura 2.31- Microplaca dos ensaios da doxorubicina com diferentes concentrações (μM).



Figura 2.32- Fotografia da linha celular A375.

A Tabela 2.44 apresenta os resultados dos ensaios biológicos para as tiobenzanilidas sintetizadas (**4.a-4.s**) e para a doxorubicina, a qual foi, utilizada como termo de comparação dos valores de EC₅₀ das tiobenzanilidas avaliadas com o EC₅₀ de um fármaco disponível no mercado usado para tratar o cancro.

Tabela 2.44- Valores de EC₅₀ (μM) obtidos para os compostos 4.a-4.s e para a doxorubicina para a linha celular A375, incubadas a 37 °C durante 24 horas; s- desvio à média e ER_{EC50}- erro relativo do EC₅₀.

Composto	EC ₅₀ ± s (μM)	Limite mínimo (μM)	Limite máximo (μM)	Declive	ER _{EC50} (%)
4.a	51,7 ± 1,1	2,0	200,0	9,6	2,2
4.b	55,5 ± 1,8	1,0	200,0	3,7	3,3
4.c	56,5 ± 1,2	1,0	200,0	5,4	2,2
4.d	67,7 ± 9,8	1,0	300,0	4,6	14,5
4.e	72,6 ± 9,6	10,0	200,0	2,7	13,2
4.f	87,5 ± 4,8	10,0	300,0	3,8	5,5
4.g	50,1 ± 2,6	0,5	300,0	2,4	5,1
4.h	26,1 ± 2,5	0,5	200,0	1,4	9,7
4.i	70,6 ± 6,8	0,5	300,0	1,9	9,6
4.j	42,4 ± 3,9	1,0	300,0	2,0	9,1
4.l	61,2 ± 3,7	0,5	250,0	2,4	6,1
4.m	> 100	-	-	-	-
4.n	> 100	-	-	-	-
4.o	51,6 ± 0,9	1,0	200,0	6,9	1,7
4.p	31,6 ± 0,6	1,0	200,0	2,9	1,8
4.q	> 100	-	-	-	-
4.r	11,8 ± 0,2	0,1	300,0	1,5	1,6
4.s	48,3 ± 1,3	2,0	200,0	6,0	2,8
Doxorubicina	6,0 ± 0,2	-	-	-	-

Pela análise dos valores dos EC₅₀ compilados na Tabela 2.44 é possível verificar que todos os valores estão na ordem do μM exceto os valores dos compostos **4.m**, **4.n** e **4.q**, os quais apresentaram EC₅₀ superiores a 100 μM . Também os compostos **4.e** e **4.f** apresentaram EC₅₀ elevados mesmo na casa dos μM , 72,6 μM e 87,5 μM , respetivamente. Quanto aos erros relativos associados à avaliação de cada composto verificou-se que apenas para os compostos **4.d** e **4.e** os valores encontrados foram superiores a 10% o que é indicativo de uma baixa dispersão dos resultados. Com os dados compilados na Tabela 2.44 foi possível relacionar as atividades anticancerígenas dos compostos testados com as alterações estruturais, pois todas as alterações estruturais levaram a uma mudança dos parâmetros determinados.

O composto **4.a** foi o que apresentou uma taxa de mortalidade mais abrupta, com um declive de 9,6, enquanto os compostos **4.h** e **4.r** foram os que apresentaram valores de declives menores, de 1,4 e de 1,5, respetivamente.

No que concerne ao limite mínimo o composto **4.r** foi o que apresentou um valor menor, de 0,1 μM , os compostos **4.e** e **4.f** foram os que apresentaram valores maiores, o que é indicativo que para estes compostos é necessário uma concentração maior para se começar a ocorrer morte celular. Relativamente ao limite máximo os valores de concentração mínima necessária para atingir o máximo de morte celular encontravam-se entre o intervalo de 200 μM e 300 μM para todos os derivados de tiobenzanilida.

Tendo em conta os resultados da Tabela 2.44 ficou claro que todas as alterações estruturais efetuadas levaram a uma mudança dos parâmetros determinados relativamente à tiobenzanilida **4.n** (EC_{50} superior a 100 μM), e na maioria dos casos os compostos sintetizados apresentaram um aumento da citotoxicidade contra a linha celular em estudo. Foi efetuada uma análise para relacionar as atividades anticancerígenas dos compostos testados com a natureza das alterações estruturais efetuadas nas tiobenzanilidas sintetizadas (agrupando os compostos com a mesma substituição na posição 2 na mesma família).

Relativamente aos compostos com o grupo CF_3 na posição 2, **4.f**, **4.g** e **4.h** contendo na posição 4' um grupo octilo, ou um grupo octiloxi e não contendo substituição, obtiveram-se valores de EC_{50} 87,9 μM , 50,1 μM e 26,1 μM , respetivamente, observando-se portanto que a não substituição na posição 4' do anel anilínico aumenta a citotoxicidade. A Figura 2.33 apresenta um gráfico ilustrativo dos EC_{50} de cada um dos compostos desta família, as curvas dose-resposta destes compostos podem ser observados no Anexo 134. Para todos os compostos os valores de EC_{50} encontrados são inferiores ao EC_{50} do composto **4.n**, e portanto a substituição nos dois anéis aromáticos parece ser importante para se obter uma maior citotoxicidade. Os compostos **4.g** e **4.h** possuem também valores de limite mínimo (0,5 μM) mais baixos que o composto **4.f** (10,0 μM). Em resumo, neste subconjunto de tiobenzanilidas, o composto **4.h** foi o que se revelou ser mais promissor.

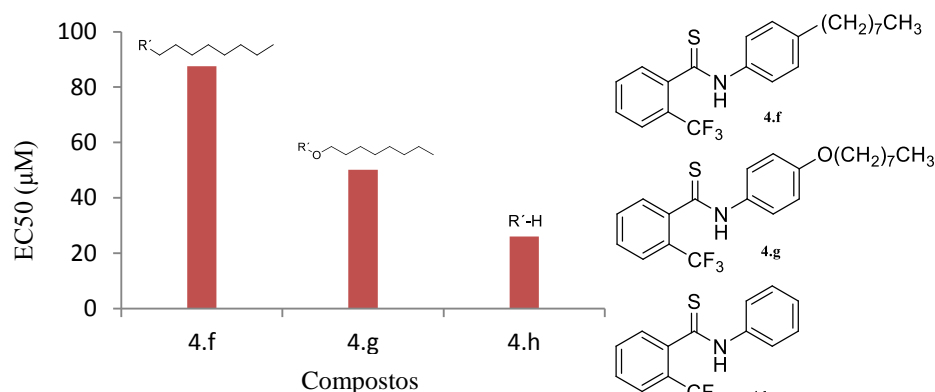


Figura 2.33- Comparação dos EC_{50} da família de compostos com 2- CF_3 (**4.f-4.h**).

A substituição na posição 2 do anel benzoílico com um grupo NO_2 , **4.a** a **4.e**, contendo respetivamente na posição 4' um grupo benzilo, fenoxi, octilo, octiloxi e sem substituinte nessa posição permitiu obter compostos mais citotóxicos contra a linha celular em estudo, tendo sido obtidos valores de EC_{50} entre 51,7 μM e 72,9 μM , comparativamente com o composto **4.n** (Tabela 2.44). Para a tiobenzanilida sem substituinte na posição 4' (**4.e**) o valor de EC_{50} foi de 72,6 μM , e o valor de limite mínimo de 10 μM , o que é indicativo de que este composto não apresenta um poder citotóxico promissor. Porém, quando se fizeram substituições na posição 4' com os substituintes benzilo (**4.a**), fenoxi (**4.b**), octilo (**4.c**) e octiloxi (**4.d**) verificou-se um aumento da atividade anticancerígena, e portanto um decréscimo dos valores de EC_{50} , para respetivamente 51,7 μM , 55,5 μM , 56,5 μM e 67,7 μM . O composto **4.a** com o substituinte benzilo, para além de ter apresentado o EC_{50} mais baixo nesta família também apresentou um valor de declive elevado sugerindo maior potência. A Figura 2.34 ilustra um gráfico dos EC_{50} de cada um dos compostos desta família, as curvas dose-resposta destes compostos estão apresentadas no Anexo 135. Pela análise dos valores de EC_{50} obtidos para os

compostos desta família é possível verificar que a natureza dos substituintes na posição 4' não alteraram significativamente os valores de EC50, os quais são todos próximos uns dos outros.

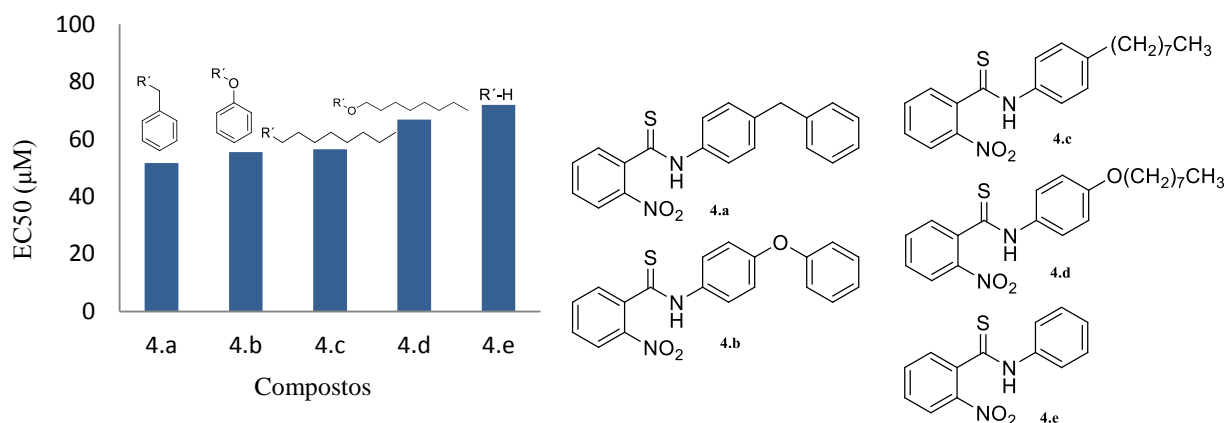


Figura 2.34- Comparação dos EC50 da família dos compostos com 2-NO₂ (4.a-4.e).

Relativamente à família de compostos que possuem dois grupos NO₂ nas posições 3,5 (**4.o** a **4.s**) foi possível constatar, a partir da análise dos resultados obtidos (Tabela 2.44), um decréscimo dos valores de EC50 calculados relativamente à tiobenzanilida **4.n**, exceto quando se substituiu a posição 4' com um grupo octilo (**4.q**).

De um modo geral, foi esta família de compostos que registou maior atividade anticancerígena, nomeadamente os compostos com os substituintes fenoxi (**4.p**) e octiloxi (**4.r**). Estas substituições na posição 4' contribuíram muito positivamente para a atividade biológica registada, conduzindo a valores de EC50 de 31,6 μM e de 11,8 μM, respetivamente. O composto **4.r** para além de apresentar o EC50 mais baixo apresentou também um valor de concentração no limite mínimo muito baixo (0,1 μM) sendo este factor uma grande vantagem na medida que é necessário uma dose muito pequena para se começar a sentir morte celular, o que indica que o composto é muito promissor contra esta linha celular. Na Figura 2.35 estão compilados, num gráfico, os valores de EC50 de cada composto pertencente a esta família, as curvas dose-resposta destes compostos podem ser observados nos Anexo 136 e Anexo 137. Esta família de compostos foi a que teve maior discrepância em termos de valores de EC50, apresentando um dos mais elevados (**4.q**) e o mais baixo (**4.r**).

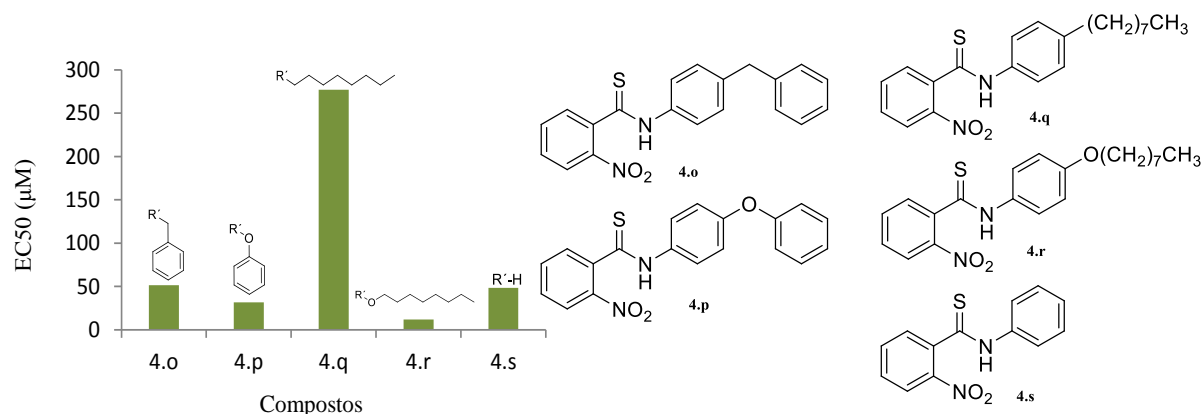


Figura 2.35- Comparação dos EC50 da família dos compostos com 3,5-NO₂ (4.o-4.s).

Para avaliar o efeito da natureza do substituinte na posição 4' na atividade dos compostos, sintetizaram-se e avaliaram-se as atividades biológicas de tiobenzanilidas não substituídas na posição 2, mas contendo os substituintes já indicados na posição 4' (**4.i-4.n**). A Figura 2.36 ilustra um gráfico comparativo dos EC50 de cada composto pertencente a esta família, as curvas dose-resposta estão

apresentadas nos Anexo 138 e Anexo 139. Dos resultados compilados na Tabela 2.44 observa-se que o composto mais citotóxico é o **4.j**, o qual possui na posição 4' um grupo fenoxi, apresentando um EC₅₀ de 42,4 µM. Nesta família o composto **4.m** foi o que apresentou o EC₅₀ maior elevado (superior a 100 µM) podendo-se assim, inferir que a introdução de um oxigénio entre o anel aromático e o grupo octilo na posição 4' faz diminuir significativamente a citotoxicidade. Para os compostos com os substituintes benzilo (**4.i**) octilo (**4.l**), os valores de EC₅₀ não revelam elevada atividade citotóxica, apesar de conduzirem a um limite inferior muito baixo (0,5 µM).

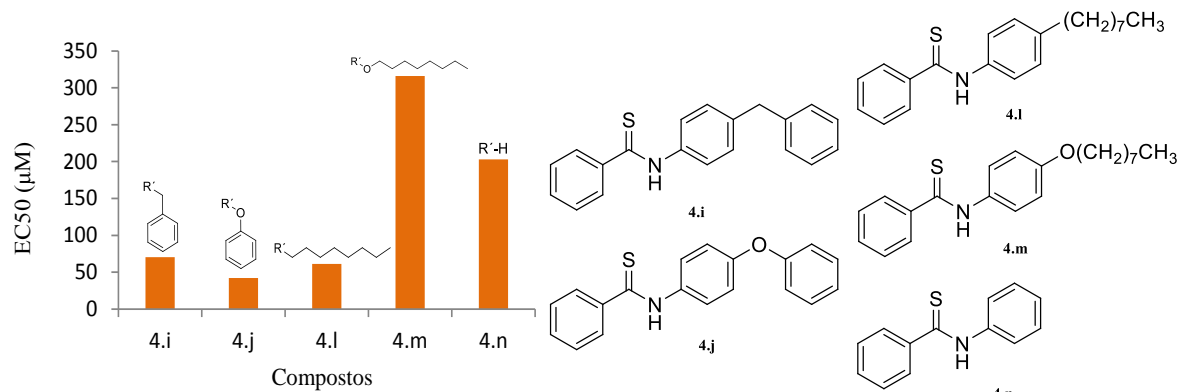


Figura 2.36- Comparação dos EC₅₀ da família dos compostos sem substituinte na posição 2 (**4.i-4.n**).

Avaliando todos os EC₅₀, alcançou-se maior potencial citotóxico contra a linha celular em estudo, com a substituição no anel aromático benzóico de dois grupos NO₂, nas posições 3 e 5, em simultâneo com um grupo octiloxi na posição 4', composto **4.r**. Aparentemente não é a presença da substituição do grupo octiloxi, que noutros casos não induziu um acréscimo da atividade, nomeadamente **4.d**, **4.m** e **4.g**, mas a conjugação de dois substituintes referidos que desempenhou um importante papel no aumento da atividade citotóxica deste composto.

O valor de EC₅₀ deste composto (11,8 µM) torna-o bastante promissor e comparável com o valor determinado para a doxorrubicina (6,0 µM). A Figura 2.37 ilustra as curvas dose-resposta para a doxorrubicina e do **4.r**. Analisando as duas curvas é possível verificar que o composto **4.r** tem um declive maior que o da doxorrubicina o que significa que uma pequena variação na concentração da tiobenzanilida **4.r** provoca um efeito maior que a mesma variação na doxorrubicina e portanto demonstra maior potência.

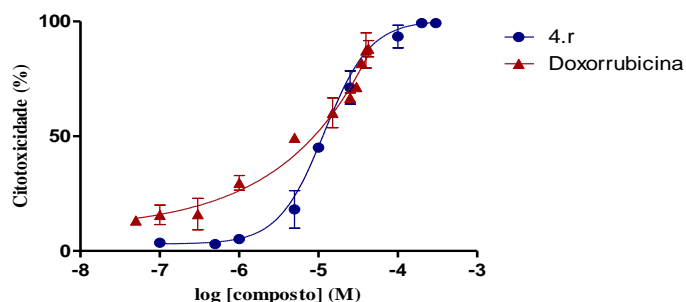


Figura 2.37- Comparação das curvas dose-resposta do composto **4.r** e da doxorrubicina.

Para além do composto **4.r**, o composto **4.h** também demonstrou ser um composto muito promissor.

2.3.2. Células do cancro da mama hormono-dependente (MCF-7)

Na linha celular MCF-7 só foi possível estudar uma família de compostos com substituinte octilo na posição 4' e o tamoxifen, composto de referência no tratamento deste tipo de cancro. Os valores de EC50 calculados são valores preliminares tendo sido determinados com o programa *Microsoft Excel* pois não foi possível determinar os patamares superiores e inferiores para cada composto. A Tabela 2.45 apresenta os valores de EC50 dos respetivos compostos, as curvas dose-resposta podem ser observadas no Anexo 140.

Tabela 2.45- Valores de EC50 (μM) preliminares obtidos para os compostos 4.c; 4.f e 4.q e o para o tamoxifen para a linha celular MCF-7, incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Composto	EC50 (μM)
4.c	14,6
4.f	27,1
4.q	15,6
Tamoxifen	7,6

Até à data de conclusão desta tese não foi possível testar todos os compostos nem todas as concentrações necessárias para determinar os valores de EC50 finais. No entanto pelos resultados apresentados na Tabela 2.45 é possível verificar que esta linha celular é mais sensível a este tipo de compostos do que a linha celular A375, pois foram obtidos valores de EC50 mais baixos comparativamente com os valores determinados dos mesmos compostos nas A375. Porém é necessário fazer mais ensaios com estes compostos de modo a confirmar estes resultados.

O composto **4.c** foi aquele que apresentou uma maior citotoxicidade (14,6 μM) estando muito próximo do valor de EC50 do composto **4.q** (15,6 μM) enquanto o **4.f** é aquele que apresentou uma menor citotoxicidade (27,0 μM). Estas diferenças de valores podem dever-se às alterações estruturais nos grupos do anel aromático principal, parecendo ocorrer um aumento da atividade anticancerígena quando se utiliza grupos NO₂, principalmente na posição 2.

Comparativamente com o Tamoxifen os valores de EC50, até agora obtidos, foram muito promissores na medida em que estão relativamente próximos do valor obtido para o próprio tamoxifen principalmente o composto **4.c**. No entanto é necessário continuar os testes de citotoxicidade dos compostos sintetizados de modo a obter informações mais fidedignas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese

3.1.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes foram obtidos nas firmas Sigma Aldrich, José Manuel Gomes dos Santos, Carlo ERBA reagentes e Technical e foram utilizados sem purificação adicional. A piridina e o tolueno, usados nas reações como solventes, foram previamente destilados e/ou secos de acordo com os métodos descritos na literatura ⁷⁴. O tolueno foi seco com hidreto de cálcio e posteriormente colocou-se em refluxo com sódio e benzofenona.

3.1.2. Materiais e equipamentos

A evolução das reações e a escolha do eluente adequado para a purificação dos compostos foram feitas através de c.c.f., tendo sido utilizadas placas com 0,25 mm de espessura de sílica-gel 60 F₂₅₄ (ref. Merck® 5554), óxido de alumínio neutro 60 F₂₅₄ (ref. Merck® 5581) e sílica gel 60 RP-18 (ref. Merck® 5559). A composição dos diversos eluentes utilizados variou consoante o carácter polar/apolar dos compostos a separar. A visualização das manchas foi feita por irradiação das placas cromatográficas com luz ultravioleta numa câmara de marca *Camag* (ref. 8120) aos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm.

Para a realização das cromatografias em camada fina preparativa (c.c.f.p.) foram utilizadas placas de vidro (20×20 cm) de sílica gel 60 F₂₅₀ com 0,5 mm de espessura (ref. Machery-Nagel mv 809053) e a visualização das manchas foi igualmente realizada por irradiação com luz UV de 254 nm.

Nas cromatografias em coluna utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 (0,004-0,06 mm, ref Merck® 9385 e ref Scharlau GE00481000), óxido de alumínio 90 ativo (0,063-0,200 mm, ref. Merck® 1077) e sílica gel de fase reversa 60 RP-18 (ref. Merck® 711021.1000). O melhor eluente a usar foi estudado para cada composto, ajustando-se o *r_f* a cerca de 0,35 ⁷⁵.

A pesagem dos compostos foi feita numa balança Precisa XT 120 A (precisão $\pm 10^{-4}$).

As experiências de RMN 1D (¹H, ¹³C e ¹³C APT) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) foram efetuadas à temperatura ambiente, excepto a experiência a temperatura variável, utilizando um aparelho da marca Bruker 400 Ultra Shield™, operando a uma frequência de 400,13 MHz para ¹H e 100,60 MHz para ¹³C. Os solventes utilizados foram CDCl₃, DMSO-*d*₆, CD₃OD, (CD₃)₂CO, C₆D₆ e THF-*d*₈ obtidos na Sigma Aldrich e Cambridge Isotope Laboratoire. Os desvios químicos são reportados em ppm usando como referência o sinal residual do solvente não deuterado utilizado na realização dos espetros (CDCl₃: $\delta_H=7,26$ ppm, $\delta_C=77,0$ ppm; DMSO-*d*₆: $\delta_H=2,50$ ppm, $\delta_C=39,5$ ppm; CD₃OD: $\delta_H=3,35$ ppm, $\delta_C=49,9$ ppm; C₆D₆: $\delta_H=7,16$ ppm, $\delta_C=128,1$ ppm; (CD₃)₂CO: $\delta_H=2,05$ ppm, $\delta_C=206,0$, 29,8 ppm; e THF-*d*₈: $\delta_H=1,72$ e 3,58 ppm, $\delta_C=39,5$ ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) são expressas em Hertz (Hz) ⁷⁶.

Os espetros de IV dos compostos sintetizados foram obtidos num espectrofotómetro Nicolet 6700 (*Thermo Electron Corp., Madison, WI*) em pastilhas de KBr.

Os espetros de ESI-HRMS foram realizados no Centro de Química Estrutural no polo do Instituto Superior Técnico da Rede Nacional de Espectrometria de Massa, num espectrómetro de massa Bruker Impact II *quadrupole time-of-flight* (Bruker Daltonis) operando nos modos positivos em modo de alta resolução. As amostras foram dissolvidas numa solução de MeOH. Os parâmetros otimizados que foram utilizados são os seguintes: voltagem do capilar: +4,5 kV; *end plate offset*: -500 V;

nebulizador: 40 psi; gás secante: 4,0 L/min; temperatura de secagem: 200 °C; m/z: 100-2000; aquisição em modo de *full-scan* com uma variação de 1,0 Hz.

O espectro de difração por raio-X de monocristal foi executado na Universidade de Aveiro pelo Professor Victor Félix, num difratómetro da Bruker SMART APEX II com um detetor de área CCD usando radiação de grafite monocromada Mo-K α ($\lambda = 0,71073$ Å) a 150(2) K. As redes foram integradas utilizando o pacote de software SAINT-Plus e as intensidades foram corrigidas pela polarização e efeitos de Lorentz. A absorção foi corrigida pela via *multi-scan* usando SADABS. A estrutura foi resolvida pela combinação dos métodos diretos com diferença subsequente da transformada de Fourier e refinada pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa em F² usando o programa SHELX-2013. Os deslocamentos térmicos anisotrópicos foram utilizados para todos os átomos com exclusão dos de hidrogénio. Os átomos de hidrogénio que estão ligados foram inseridos em posições geométricas $U_{iso} = 1,2U_{eq}$.

3.2. Ensaio de citotoxicidade

No estudo das atividades biológicas utilizaram-se as linhas celulares do cancro da mama hormono-dependente MCF-7 (ATCC HTB-22) e A375 (ATCC CRL 1619) de melanoma maligno da pele cedidas pelo Campus Tecnológico Nuclear (CTN) na pessoa da Doutora Fernanda Marques. O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Biowhittaker Lonza com 4,5 g/L de glucose) com 4,5 g/L de glucose, 1% pen-strep (mistura de penicilina e estreptomicina), 1% de L-glutamina e a tripsina $10 \times$ foram adquiridas na BioWhittaker Lonza. O soro fetal bovino (FBS) foi obtido na Biowest. O SDS (dodecil sulfato de sódio) e o tamoxifeno foram obtidos na Sigma-Aldrich e o MTT ultra puro utilizado foi obtido na VWR. A doxorubicina foi adquirida na BioVision.

A manipulação das células foi feita dentro de uma câmara de fluxo laminar (ESCO Class II Biohazard Safety Cabinet), para conferir as condições de esterilidade necessárias e as células foram observadas através de um microscópio MOTIC AE21.

3.3. Síntese dos derivados de tiobenzanilida ²

3.3.1. Procedimento geral para a síntese das benzanilidas 3.a-3.f e 3.l

Num balão de duas tubuladuras, mantido em banho de gelo, dissolveram-se as aminas em piridina e em seguida, adicionaram-se, gota a gota os halogenetos de acilo correspondentes. Após a adição dos cloretos de acilo levou-se a mistura reacional a refluxo, por um tempo variável consoante a reação, seguido de um tempo à temperatura ambiente apenas com agitação. A evolução da reação foi controlada por c.c.f., utilizando como mistura de eluentes n-hexano/acetato de etilo e/ou benzeno/n-hexano.

A mistura reacional foi vertida sobre água (50 mL) e extraiu-se da primeiramente com diclorometano (3×15 mL) e em seguida com acetato de etilo (3×15 mL). As fases orgânicas combinadas foram evaporadas no evaporador rotativo e o resíduo obtido foi redissolvido em diclorometano e extraído com uma solução de NaHCO₃ (hidrogenocarbonato de sódio) a 5% (2×50

² Na parte experimental serão apresentados compostos que não foram apresentados na parte da apresentação e discussão de resultados por já terem sido sintetizados e objeto de discussão em trabalhos anteriores. No entanto foi necessário voltar a sintetizá-los e purificá-los para se poderem avaliar as respetivas atividades biológicas. As numerações dos compostos resintetizados foram feitas dando continuidade à dos novos compostos.

mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura no evaporador rotativo. Os compostos foram purificados por sucessivas recristalizações com os solventes ou misturas de solventes adequados. As condições específicas para cada benzanilida encontram-se compiladas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Condições reacionais de síntese das benzanilidas 3.a-3.f e 3.l.

Composto	Amina g (mmol)	Cloreto de ácido g (mmol)	Volume de py (mL)	Eluente usado na c.c.f.	Tempo de refluxo (horas)	Tempo total de reação (total)	Massa produto bruto (g)
3.a	1,00 (4,8)	0,888 (4,8)	2,6	hexano/acetato de etilo 6:4	11: 10	21: 00	1,680
3.b	1,00 (5,4)	0,999 (5,4)	3,0	benzeno/hexano 9:1	8: 00	24: 00	1,860
3.c	1,00 (4,8)	0,888 (4,8)	2,6	hexano/acetato de etilo 6:4	3: 30	24: 00	1,935
3.d	1,50 (6,8)	1,199 (6,8)	5,0	hexano/acetato de etilo 6:4	9: 45	26: 00	2,700
3.e	1,022 (11,0)	2,035 (11,0)	2,6	hexano/acetato de etilo 6:4	7,15	22: 00	2,845
3.f	0,575 (2,8)	0,582 (2,8)	2,5	hexano/acetato de etilo 6:4	2: 00	2: 00	1,206
3.l	2,004 (10,8)	1,518 (10,8)	6,0	benzeno/hexano 9:1	12: 00	28: 15	3,623

3.3.1.1. Síntese e caracterização da *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzamida, **3.a**

A síntese do composto **3.a** foi realizada seguindo o procedimento geral descrito no ponto 3.3.1. O produto foi purificado por recristalização com éter de petróleo (40-60 °C)/ metanol e obtido com um rendimento de 39,0%.

Estado físico: sólido amorfo branco.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 8,13 (d, 1H, 8,2, H₃); 7,73 (t, 1H, 7,0, H₅); 7,64 (m, 1H, H₆); 7,62 (m, 1H H₄); 7,52 (d, 2H, 8,3, H₂'-H₆'); 7,42 (s, NH); 7,30 (t, 2H, 7,3, H₃''-H₅'); 7,21 (m, 2H, H₃'-H₆); 7,20 (m, 1H, H₄'); 7,19 (m, 2H, H₂''-H₆'); 3,98 (s, 2H, CH₂).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 164,74 (C=O); 146,40 (C₂); 141,03 (C₁''); 138,28 (C₄); 135,25 (C₁); 133,93 (C₅); 133,07 (C₁); 130,80 (C₄); 129,67 (C₃'-C₅); 128,86 (C₂''-C₆''); 128,58 (C₃''-C₅'); 128,50 (C₆); 126,15 (C₄'); 124,77 (C₃); 120,61 (C₂'-C₆') e 41,36 (CH₂).

IV (KBr) ν_{máx}/ cm⁻¹: 3302,4 (elongação N-H); 3021,3 (elongação C-H aromática); 1647,1 (elongação C=O); 1593,8 (elongação C-C aromática); 1523,9 (elongação NO₂); 1493,1-1450,2 (elongação CH₂ e CH₃); 1362,5 (elongação C-NO₂); 838,9-695,7 (torção C-H).

3.3.1.2. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-(4-fenoxifenil)benzamida, **3.b**

A benzanilida **3.b** foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.3.1. O produto foi purificado por recristalização com éter dietílico, tendo sido obtido puro com um rendimento de 44,0%.

Estado físico: sólido amorfo acinzentado.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 8,09 (d, 1H, 8,2, H3); 7,70 (m, H5 e NH); 7,62 (m, 1H, H6); 7,60 (m, 1H, H4); 7,53(d, 2H, 8,9, H2'-H6'); 7,34 (t, 2H, 8,00, H3''-H5''); 7,11 (t, 1H, 7,4, H4''); 7,01 (m, 4H, H3'-H5' e H2''-H6'').

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 164,43 (C=O); 157,29 (C1'); 154,27 (C4'); 146,24 (C2); 133,94 (C5); 132,75 (C1); 130,76 (C4); 129,77 (C3'' e C5''); 128,61 (C6); 124,70 (C3); 123,26 (C4''); 122,31 (C2'-C6'); 119,59 (C3'-C5'); 118,59 (C2''-C6'').

IV (KBr)ν_{máx}/cm⁻¹: 3281,3 (elongação N-H), 3037,7 (elongação C-H aromático), 1652,4 (elongação C=O); 1522,3 (elongação NO₂), 1361,4 (elongação C-NO₂), 1014,8 (elongação C-O-C), 873,4-688,9 (torção C-H).

3.3.1.3. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-(4-octilfenil)benzamida, **3.c**

O composto **3.c** foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.3.1. O produto foi purificado por recristalização com éter de petróleo (40-60 °C)/metanol e obtido com um rendimento de 92,8%.

Estado físico: sólido amorfo branco.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 8,11 (d, 1H, 8,1, H3); 7,72 (t, 1H, 7,4, H5); 7,63 (m, 1H, H6); 7,60 (m, 1H, H4); 7,48 (m, H2'-H6' e NH); 7,18 (d, 2H, 8,1, H3'-H5'); 2,59 (t, 2H, 7,6, H1''); 1,59 (m, 2H, H2''); 1,27 (m, 10H, H3'', H4'', H5'', H6'' e H7''); 0,88 (m, 3H, H8'').

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 164,23 (C=O); 146,31 (C2); 140,09 (C4'); 134,79 (C1'); 133,90 (C5); 132,97 (C1); 130,72 (C4); 129,05 (C3'-C5'); 128,61 (C6); 124,72 (C3); 120,48 (C2'-C6'); 35,41 (C1''); 31,87 (C6''); 31,51 (C2''); 29,46 (C4'' ou C5''); 29,95 (C4'' ou C5''); 29,23 (C3''); 22,66 (C7''); 14,10 (C8'').

IV (KBr) ν_{máx}/cm⁻¹: 3318,9 (elongação N-H), 2957,0-2852,8 (elongação C-H aromático), 1646,5 (elongação C=O); 1593,2 (elongação C-C aromático), 1522,5 (elongação NO₂), 1467,3-1412,3 (elongação CH₂ e CH₃), 820,4-669,1 (torção C-H).

3.3.1.4. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzamida, **3.d**

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.1. O produto foi purificado por recristalização éter dietílico/metanol obtendo-se o composto com um rendimento de 74,0%.

Estado físico: sólido amorfo bege.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 8,10 (d, 1H, 8,2, H3); 7,70 (m, 1H, H5); 7,63 (m, 1H, H6); 7,61 (m, 1H, H4); 7,46 (m, H2'-H6' e NH); 6,89 (d, 2H, 8,3, H3'-H5'); 3,95 (t, 2H, 5,9, H1''); 1,78 (t, 2H, 6,7, H2''); 1,43 (m, 2H, H3''); 1,36 (m, 2H, H5''); 1,32 (m, 2H, H4''); 1,31 (m, 2H, H7''); 1,30 (m, 2H, H6''); 0,89 (m, 3H, H8'').

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 164,32 (C=O); 156,68 (C4'); 146,28 (C2); 133,88 (C5); 132,95 (C1); 130,66 (C4); 129,95 (C1'); 128,64 (C6); 124,68 (C3); 122,46 (C2'-C6'); 114,80 (C3'-C5'); 68,30 (C1''); 31,80 (C6''); 29,34 (C5''); 29,22 (C2'' e C4''); 26,00 (C3''); 22,64 (C7''); 14,10 (C8'').

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3279,7 (elongação N-H); 3066,5-2853,5 (elongação C-H aromática); 1645,2 (elongação C=O); 1596,2 (elongação C-C aromática); 1529,0 (elongação NO₂); 1474,2 (elongação CH₂ e CH₃); 1353,3 (elongação C-NO₂); 823,4-695,1 (torção C-H).

3.3.1.5. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-fenilbenzamida, 3.e

O composto **3.e** foi sintetizado de acordo com o procedimento geral 3.1.1. O produto foi purificado por recristalização com metanol tendo sido obtido puro com um rendimento de 30,5%.

Estado físico: sólido amorfo branco.

¹H-RMN [CD₃CD, δ /ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 10,51 (s, NH); 8,18 (d, 1H, 8,2, H3); 7,84 (t, 1H, 7,5, H5); 7,74 (m, 1H, H4); 7,71 (m, 1H, H6); 7,62 (d, 2H; 7,6, H2' - H6'); 7,37 (m, 2H; H3' - H5'); 7,17 (m, 1H, H4').

¹³C-RMN [CD₃CD, δ /ppm (atribuição)]: 167,87 (C=O); 147,90 (C2); 139,63 (C1'); 135,24 (C5); 134,27 (C1); 131,96 (C4); 130,13 (C6); 129,95 (C3'-C5'); 125,88 (C4'); 125,59 (C3); 121,65 (C2' - C6').

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3252,2 (elongação N-H), 3193,1-3039,0 (elongação C-H aromático), 1656,2 (elongação C=O); 1598,9 (elongação C-C aromática), 1529,9 (elongação NO₂), 1486,9 (elongação C-N), 1346,1 (elongação C-NO₂), 888,3-699,1 (torção C-H).

3.3.1.6. Síntese e caracterização da *N*-(4-octilfenil)-2-(trifluorometil)benzamida, 3.f

O composto **3.f** foi sintetizado de acordo com o procedimento geral 3.1.1. O produto foi purificado por recristalização com éter de petróleo (40-60 °C) e obtido com um rendimento de 61,8%.

Estado físico: cristais cor-de-rosa.

¹H-RMN [CDCl₃, δ /ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 7,74 (d, 1H, 7,7, H3); 7,64 (m, 1H, H6); 7,62 (m, 1H, H5); 7,58 (m, 1H, H4); 7,48 (m, H2'-H6' e NH); 7,18 (d, 2H, 8,2, H3' - H5'); 2,59 (t, 2H, 5,9, H1''); 1,60 (m, 2H, H2''); 1,30 (m, 10H, H3'', H4'', H5'', H6'', H7''); 0,88 (t, 3H, 6,7, H8'').

¹³C-RMN [CDCl₃, δ /ppm (atribuição)]: 165,56 (C=O); 139,92 (C4'); 136,90 (C1'); 134,99 (C1); 132,16 (C5); 130,90 (C4); 128,99 (C3'-C5'); 128,61 (C6); 126,53-126,43 (C3); 125,22 (C2); 122,38 (CF₃); 120,85 (C2'-C6'); 36,40 (C1''); 31,87 (C6''); 31,51 (C2''); 29,46 (C3''); 29,25 (C5''); 29,24 (C4''); 22,65 (C7''); 14,09 (C8''). (Anexo 92 a Anexo 96)

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3316,0 (N-H), 2957,3-2852,9 (elongação C-H aromática), 1655,5 (elongação C=O); 1519,6 (elongação C-C), 1491,4 (elongação C-N), 1313,5 (elongação C-F), 1467,5-1465,2 (elongação CH₂ e CH₃), 821,51-680,1 (torção C-H). (Anexo 97)

3.3.1.7. Síntese e caracterização da *N*-(4-fenoxifenil)benzamida, 3.l

O composto **3.l** foi sintetizado de acordo com o procedimento geral 3.1.1. O produto foi purificado por recristalização com metanol tendo sido obtido com um rendimento de 47,4%.

Estado físico: sólido amorfo cinzento.

¹H-RMN [CDCl₃, δ /ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 9,01 (s); 7,87 (d, 2H, 7,3, H2 e H6, NH); 7,60 (m, 2H, H2'-H6'); 7,54 (m, 1H, H5); 7,46 (t, 2H, 7,4, H3 e H4); 7,34 (t, 2H, 8,1, H3''-H5''); 7,10 (t, 1H, 7,4, H4''); 7,01 (t, 4H, 8,2, H3'-H5' e H2'' - H6'').

¹³C-RMN [CDCl₃, δ /ppm (atribuição)]: 165,70 (C=O); 157,49 (C1''); 153,70 (C4'); 134,82 (C1); 133,33 (C1'); 131,85 (C4); 129,72 (C3''-C5''); 128,78 (C3 e C5); 126,98 (C2 e C6); 123,11 (C4''); 121,98 (C2'-C6'); 119,64 (C3'-C5'); 118,46 (C2''-C6''). (Anexo 119 a Anexo 123).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3335,5 (elongação N-H), 1649,1 (elongação C=O); 1508,6 (elongação C-C aromática), 1487,4 (elongação C-N), 1027,0 (elongação C-O-C), 873,4-660,4 (torção C-H). (Anexo 124).

3.3.2. Procedimento geral para a síntese das tiobenzanilidas 4.a-4.f, 4.h, 4.j, 4.l

Num balão de duas tubuladuras, adaptado com um refrigerante de refluxo e com um tubo protetor de humidade com cloreto de cálcio, dissolveram-se as benzanilidas, previamente secas sob vácuo, em tolueno seco sob agitação. Para facilitar a dissolução das benzanilidas aqueceram-se as misturas reacionais a uma temperatura inferior ao ponto de ebulição do tolueno (110 °C). Posteriormente adicionou-se em pequenas porções o reagente de Lawesson (LR) e as reações foram deixadas em refluxo, por um tempo variável de acordo com o evoluir de cada reação.

A evolução das reações foi avaliada por c.c.f.. Dando-se as reações por terminadas, as misturas reacionais foram evaporadas à secura no evaporador rotativo e submetidas a uma ou várias cromatografias em coluna e/ou cromatografia em placa preparativa, a fim de obter as tiobenzanilidas puras. Na Tabela 3.2 encontram-se compiladas as condições reacionais utilizadas na síntese de cada tiobenzanilida.

Tabela 3.2- Condições reacionais de síntese das tiobenzanilidas 4.a-4.f, 4.h, 4.j-4.l.

Composto	Benzamida g (mmol)	LR g (mmol)	Volume de tolueno (mL)	Eluente usado na c.c.f.	Tempo de refluxo (horas)	Tempo total de reação (total)	Massa produto bruto (g)
4.a	0,660 (1,9)	0,416 (1,0)	12,0	hexano/acetato de etilo 6,5:3,5	17: 00	22: 00	1,170
4.b	0,744 (2,2)	0,459 (1,1)	10,0	hexano/acetato de etilo 6:4	7: 00	8: 00	1,350
4.c	0,966 (2,7)	0,578 (1,4)	15,0	hexano/acetato de etilo 8:2	2: 30	2: 30	1,596
4.d	1,277 (3,5)	0,698 (1,7)	15,0	hexano/acetato de etilo 8,9:1,9	17: 00	49: 00	1,980
4.e	1,127 (4,7)	0,942 (2,3)	12,5	hexano/acetato de etilo 8:2	10: 00	10: 00	2,100
4.f	0,500 (1,3)	0,260 (0,6)	14,0	hexano/acetato de etilo 8:2	4: 00	24: 30	0,861
4.h	0,350 (1,3)	0,267 (0,7)	6,0	hexano/acetato de etilo 8:2	17: 20	33: 00	0,730
4.j	1,600 (5,5)	1,133 (2,8)	22,0	hexano/acetato de etilo 8:2	17: 00	31: 00	2,961
4.l	0,131 (0,40)	0,081 (0,2)	6,0	hexano/acetato de etilo 8:2	10: 20	66: 00	0,200

3.3.2.1. Síntese e caracterização da *N*-(4-benzilfenil)-2-nitrobenzotioamida, **4.a**

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. Purificaram-se cerca de 0,500 g da tioamida **4.a** através de cromatografia em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 2 cm e uma altura de fase estacionária de 25 cm) usando como fase estacionária alumina e como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etilo 7,5:2,5. Foram recolhidas 102 frações com aproximadamente 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 12 a 78 que correspondiam ao produto pretendido cromatograficamente puro foram juntas, tendo-se obtido desta

forma 0,401 g de **4.a** com um rendimento do produto purificado de 57,9%. Cristalizaram-se cerca de 0,100 g com éter etílico para se realizar o raio-X de monocristal.

Estado físico: cristais amarelos em forma de agulha.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 9,80 (s, NH *cis*); 8,95 (s, NH *trans*); 8,02 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 7,91 (d, 1H, 8,2, H3 *cis*); 7,67 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,64 (m, 1H, H5 *trans*); 7,56 (dd, 1H, 7,7, 1,4, H6 *trans*); 7,52 (m, 1H, H4 *trans*); 7,51 (m, 1H, H5 *cis*); 7,40 (td, 1H, 8,5, 1,4, H4 *cis*); 7,34 (m, 1H, H6 *cis*); 7,32 (m, 2H, H3''-H5'' *trans*); 7,27 (m, 2H, H2''-H6'' *trans*); 7,26 (m, 2H *trans* e 2H *cis*, H3'-H5' *trans* e H3''-H5'' *cis*); 7,22 (m, 1H, H4'' *trans*); 7,21 (m, 1H, H4'' *cis*); 7,07 (d, 2H, 7,0, H2''-H6'' *cis*); 6,98 (d, 2H, 8,5, H3'-H5' *cis*); 6,82 (d, 2H, 8,3, H2'-H6' *cis*); 4,01 (s, 2H, CH₂ *trans*); 3,86 (s, 3H, CH₂ *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 198,13 (C=S *cis*); 194,98 (C=S *trans*); 145,35 (C2 *cis*); 145,04 (C2 *trans*); 140,59 (C4' *trans*); 140,46 (C4' *cis*); 140,40 (C1'' *trans*); 140,05 (C1'' *cis*); 139,27 (C1 *trans*); 136,25 (C1 *cis*); 136,13 (C1' *trans*); 135,78 (C1' *cis*); 133,74 (C5 *trans*); 133,48 (C5 *cis*); 129,76 (C3'-C5' *cis*); 129,74 (C4 *trans*); 129,57 (C4 *cis*); 129,52 (C3'-C5' *trans*); 128,94 (C6 *cis*); 128,93 (C6 *trans*); 128,90 (C2''-C6'' *trans*); 128,81 (C2''-C6'' *cis*); 128,56 (C3''-C5'' *trans*); 128,51 (C3''-C5'' *cis*); 126,29 (C4'' *trans*); 126,25 (C4'' *cis*); 124,72 (C3 *trans*); 124,59 (C3 *cis*); 123,71 (C2'-C6' *trans*); 123,55 (C2'-C6' *cis*); 41,52 (CH₂ *trans*); 41,37 (CH₂ *cis*).

¹H-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 12,58 (s, NH *cis*); 12,25 (s, NH *trans*); 8,08 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 7,97 (d, 1H, 4,1, H3 *cis*); 7,80 (m, 1H, H5 *trans*); 7,79 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,65 (m, 1H, H4 *trans*); 7,61 (m, 1H, H6 *trans*); 7,58 (m, 1H, H5 *cis*); 7,50 (t, 1H, 8,2, H4 *cis*); 7,30 (m, 2H, H3'-H5' *trans*); 7,33-7,22 (m, 4H, H2''-H6'' *trans*; H3''-H5'' *trans*); 7,33-7,22 (m, 3H, H3''-H5'' *cis*; H6 *cis*); 7,19 (t, 1H, 7,1, H4'' *trans*); 7,19 (t, 1H, H4'' *cis*); 7,13 (d, 2H, 8,2, H2''-H6'' *cis*); 7,05 (d, 2H, 8,4, H3'-H5' *cis*); 6,91 (d, 2H, 8,4, H2'-H6' *cis*); 3,96 (s, 2H, CH₂ *trans*); 3,82 (s, 2H, CH₂ *cis*).

¹³C-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (atribuição)]: 195,84 (C=S *cis*); 193,23 (C=S *trans*); 145,77 (C2 *cis*); 145,08 (C2 *trans*); 141,13 (C1'' *trans*); 140,82 (C1'' *cis*); 139,80 (C4' *trans*); 139,57 (C4' *cis*); 139,09 (C1 *trans*); 137,30 (C1' *trans*); 137,17 (C1 *cis*); 136,87 (C1' *cis*); 133,93 (C5 *trans*); 133,81 (C5 *cis*); 129,80 (C4 *trans*); 129,63 (C4 *cis*); 129,27 (C3'-C5' *cis*); 129,08 (C6 *trans*); 128,96 (C3'-C5' *trans*); 128,71 (C3''-C5'' *trans*); 128,64 (C2''-C6'' *cis*); 128,52 (C2''-C6'' *trans*); 128,46 (C6 *cis*); 126,39 (C3''-C5'' *cis*); 126,08 (C4'' *trans*); 126,08 (C4'' *cis*); 124,64 (C3 *cis*); 124,33 (C3 *trans*); 123,52 (C2'-C6' *cis*); 123,13 (C2'-C6' *trans*); 40,71 (CH₂ *trans*); 40,29 (CH₂ *cis*).

IV (KBr) ν_{máx}/cm⁻¹: 3218 (elongação N-H), 3183-2861 (elongação C-H aromático), 1601 (elongação C-C aromática), 1528 (elongação NO₂), 1351 (elongação C-NO₂), 1179 (elongação C=S), 853-625 (torção C-H).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₂₀H₁₆N₂O₂S+H⁺]: calculado: 349,1005; experimental 349,1002.

3.3.2.2. Síntese e caracterização da 2-nitro-N-(4-fenoxilfenil)benzotioamida, **4.b**

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. Purificaram-se cerca de 0,774 g da tioamida **4.a** através de cromatografias em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 4 cm e uma altura de fase estacionária de 17 cm) usando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etilo 6,5: 3,5. Foram recolhidas 168 com aproximadamente 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 116 a 165 que correspondiam ao mesmo perfil cromatográfico foram juntas, tendo-se obtido desta forma 0,456 g de uma mistura que continha **4.b** e umas impurezas. Com estas frações fez-se uma nova cromatografia em coluna aberta usando as mesmas condições da primeira coluna. Foram recolhidas 80 frações com aproximadamente 1 mL. As frações 21-60 que correspondiam ao produto pretendido

cromatograficamente puro foram juntas, tendo-se obtido desta forma 0,305 g de **4.b** com um rendimento do produto purificado de 45,0%.

Estado físico: Sólido amorfo amarelo.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 9,90 (s, NH *cis*); 9,07 (s, NH *trans*); 8,03 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 7,92 (d, 1H, 8,2, H3 *cis*); 7,69 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,65 (m, 1H, H5 *trans*); 7,56 (m, 1H, H6 *trans*); 7,54 (m, 1H, H5 *cis*); 7,52 (m, 1H, H4 *trans*); 7,42 (m, 1H, H4 *cis*); 7,35 (m, 2H, H3''-H5'' *trans*); 7,34 (m, 1H, H6 *cis*); 7,32 (m, 2H, H3''-H5'' *cis*); 7,14 (m, 1H, H4'' *trans*); 7,12 (m, 1H, H4'' *cis*); 7,06 (m, 2H, H2''-H6'' *trans*); 7,04 (m, 2H, H3'-H5' *trans*); 6,91 (m, 2H, H2''-H6'' *cis*); 6,90 (m, 2H, H3'-H5' *cis*); 6,77 (m, 2H, H2'-H6' *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 198,33 (C=S *cis*); 196,18 (C=S *trans*); 156,46 (C1'' *trans*); 156,28 (C4' *trans*); 156,28 (C4' *cis*); 156,03 (C1'' *cis*); 145,37 (C2 *cis*); 145,00 (C2 *trans*); 139,15 (C1 *trans*); 136,12 (C1 *cis*); 133,77 (C5 *trans*); 133,51 (C5 *cis*); 133,02 (C1' *trans*); 132,61 (C1' *cis*); 129,88 (C3''-C5'' *cis*); 129,87 (C3''-C5'' *trans*); 129,79 (C4 *trans*); 129,62 (C4 *cis*); 129,04 (C6 *cis*); 128,96 (C6 *trans*); 125,46 (C2'-C6' *trans*); 125,46 (C3'-C5' *cis*); 124,72 (C3 *trans*); 124,59 (C3 *cis*); 124,02 (C4'' *trans*); 123,81 (C4'' *cis*); 119,30 (C3'-C5' *trans* e C2''-C6'' *cis*); 118,77 (C2''-C6'' *trans* C2'-C6' *cis*).

¹H-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J*, atribuição)]: 12,70 (s, NH *cis*); 10,40 (s, NH *trans*); 8,20 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 8,07 (d, 1H, 8,2, H3 *cis*); 8,00 (d, 2H, 8,9, H2'-H6' *trans*); 7,91 (t, 1H, 7,5, H5 *trans*); 7,77 (m, 1H, H4 *trans*); 7,74 (m, 1H, H6 *trans*); 7,73 (m, 1H, H5 *cis*); 7,62 (t, 1H, 7,8, H4 *cis*); 7,52 (t, 2H, 7,6, H3''-H5'' *trans*); 7,46 (t, 2H, 8,0, H3''-H5'' *cis*); 7,40 (d, 1H, 7,6, H6 *cis*); 7,27 (d, 1H, 7,4, H4'' *trans*); 7,27 (d, 1H, 7,4, H4'' *cis*); 7,22 (d, 2H, 8,5, H3'-H5' *trans*); 7,16 (d, 2H, 7,8, H2''-H6'' *trans*); 7,11 (d, 2H, 8,8, H3'-H5' *cis*); 7,02 (d, 2H, 7,7, H2''-H6'' *cis*); 6,93 (d, 2H, 8,88, H2'-H6' *cis*).

¹³C-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (atribuição)]: 196,99 (C=S *cis*); 193,16 (C=S *trans*); 156,54 (C1'' *trans*); 156,54 (C1'' *cis*); 154,62 (C4' *trans*); 154,62 (C4' *cis*); 145,09 (C2 *trans*); 139,02 (C1 *trans*); 136,98 (C2 *cis*); 134,72 (C1' *trans*); 134,21 (C1' *cis*); 133,95 (C5 *trans*); 133,83 (C5 *cis*); 130,16 (C3''-C5'' *trans*); 129,84 (C4 *trans*); 129,68 (C4 *cis*); 129,10 (C6 *trans*); 128,06 (C6 *cis*); 125,45 (C3'-C5' *cis*); 124,82 (C2'-C6' *trans*); 124,60 (C3 *cis*); 124,36 (C3 *trans*); 123,78 (C4'' *trans*); 123,68 (C4'' *cis*); 118,83 (C2'-C6' *cis*); 118,71 (C3'-C5' *trans*); 118,69 (C2''-C6'' *trans*).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3036 (elongação C-H), 1588 (elongação C-C aromática), 1527 (elongação NO₂), 1342 (elongação C-NO₂), 1242 (elongação C=S), 1020 (elongação C-OC), 871-691 (torção C-H).

HRMS (ESI(+), *m/z*) [C₁₉H₁₄N₂O₃S+H⁺]: calculado: 351,0798; experimental 351,0795.

3.3.2.3. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-(4-octilfenil)benzotioamida, **4.c**

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. O produto foi purificado (1,596 g) através de duas cromatografias em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 4 cm e uma altura de fase estacionária de 17 cm) usando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etilo 7,4:2,6. Na primeira coluna foram introduzidas 1,00 g de produto bruto e foram recolhidas 268 frações com aproximadamente 1mL; na segunda coluna foram introduzidos 0,596 g de produto bruto e recolhidas 300 frações também com aproximadamente 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 100 a 150 da primeira coluna e as frações 21 a 40 da segunda coluna foram juntas, num total de 0,741 g recromatografadas nas mesmas condições que as colunas anteriores, mas tendo-se usado como fase móvel hexano/éter dietílico 5,3:4,7. Desta coluna foram recolhidas 122 frações, juntaram-se as frações 53 a 80 com um perfil cromatográfico idêntico mas que denunciava ainda impurezas.

Fez-se uma nova cromatografia em coluna aberta com 0,102 g usando como fase estacionária sílica de fase reversa e com fase móvel 100% de metanol, obtendo-se desta forma 0,059 g de **4.c** puro com um rendimento do produto purificado de 12,6%.

Estado físico: Sólido amorfo amarelo.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 9,72 (s, NH *cis*); 8,93 (s, NH *trans*); 8,04 (d, 1H, 8,3, H3 *trans*); 7,92 (d, 1H, 7,9, H3 *cis*); 7,69 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,66 (m, 1H, H5 *trans*); 7,59 (d, 1H, 6,9, H6 *trans*); 7,53 (m, 1H, H4 *trans*); 7,53 (m, 1H, H5 *cis*); 7,41 (m, 1H, H4 *cis*); 7,37 (m, 1H, H6 *cis*); 7,25 (m, 2H, H3'-H5' *trans*); 6,96 (d, 2H, 4,2, H3''-H5'' *cis*); 6,81 (d, 1H, 8,2, H2'-H6' *cis*); 2,63 (t, 2H, 7,8, H1'' *trans*); 2,47 (t, 2H, 7,8, H1'' *cis*); 1,63 (m, 2H, H2'' *trans*); 1,47 (m, 2H, H2'' *cis*); 1,27 (m, 10H, H3'' a H7'' *trans*) 1,27 (m, 10H, H3'' a H7'' *cis*); 0,87 (m, 3H, H8'' *trans*) 0,87 (m, 3H, H8'' *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 198,23 (C=S *cis*); 194,96 (C=S *trans*); 145,63 (C2 *cis*); 145,30 (C2 *trans*); 142,56 (C4' *trans*); 142,35 (C4' *cis*); 139,39 (C1 *trans*); 136,36 (C1 *cis*); 135,70 (C1' *trans*); 135,34 (C1' *cis*); 133,72 (C5 *trans*); 133,43 (C5 *cis*); 129,75 (C4 *trans*); 129,49 (C4 *cis*); 129,18 (C3'-C5' *cis*); 129,05 (C6 *cis* e C3'-C5' *trans*); 128,98 (C6 *trans*); 124,74 (C3 *trans*); 124,57 (C3 *cis*); 123,59 (C2'-C6' *trans*); 123,53 (C2'-C6' *cis*); 35,62 (C1'' *trans*); 35,26 (C1'' *cis*); 31,86 (C2'' *trans*); 31,79 (C2'' *cis*); 31,33 (C6'' *trans*); 31,03 (C6'' *cis*); 29,44 (C5'' *trans*); 29,33 (C5'' *cis*); 29,29 (C4'' *trans*); 29,23 (C3'' *trans*); 29,18 (C3'' *cis*); 29,07 (C4'' *cis*); 22,65 (C7'' *trans*); 22,62 (C7'' *cis*); 14,10 (C8'' *trans*); 14,08 (C8'' *cis*).

¹H-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 12,55 (s, NH *cis*); 12,23 (s, NH *trans*); 8,10 (d, 1H, 7,9, H3 *trans*); 7,96 (d, 1H, 7,9, H3 *cis*); 7,81 (m, 1H, H5 *trans*); 7,77 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,66 (m, 1H, H6 *trans*); 7,44 (m, 1H, H4 *trans*); 7,62 (m, 1H, H5 *cis*); 7,58 (d, 1H, 7,1, H6 *cis*); 7,50 (t, 1H, 7,9, H4 *cis*); 7,27 (d, 2H, 8,3, H3'-H5' *trans*); 7,01 (d, 2H, 8,3, H2'-H6' *cis*); 6,89 (d, 2H, 8,3, H3'-H5' *cis*); 2,59 (t, 2H, 7,9, H1'' *trans*); 2,43 (t, 2H, 7,5, H1'' *cis*); 1,57 (m, 2H, H2'' *trans*); 1,44 (m, 2H, H2'' *cis*); 1,24 (m, 10H, H3'' a H7'' *trans*) 1,24 (m, 10H, H3'' a H7'' *cis*); 0,85 (m, 3H, H8'' *trans*) 0,85 (m, 3H, H8'' *cis*).

¹³C-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (atribuição)]: 193,03 (C=S *trans*); 145,10 (C2 *trans*); 140,90 (C4' *trans*); 139,12 (C1 *trans*); 137,00 (C1' *trans*); 133,92 (C5 *trans*); 133,76 (C5 *cis*); 129,77 (C4 *trans*); 129,08 (C6 *trans*); 128,80 (C3'-C5' *cis*); 128,49 (C3'-C5' *trans*); 124,33 (C3 *trans*); 123,42 (C2'-C6' *cis*); 122,89 (C2'-C6' *trans*); 34,79 (C1'' *trans* e C1'' *cis*); 31,31 (C6'' *trans*); 31,25 (C6'' *cis*); 30,97 (C2'' *trans*); 30,66 (C2'' *cis*); 28,87 (C4'' *trans*); 28,71 (C3'' *trans*); 28,67 (C5'' *trans*); 22,12 (C7'' *trans*); 22,09 (C7'' *cis*); 14,00 (C8'' *trans*); 13,98 (C8'' *cis*).

IV (KBr) ν_{máx}/cm⁻¹: 3110 (elongação C-H); 2920-2849 (elongação C-H aromática); 1527 (elongação C-C aromática); 1508 (elongação NO₂); 1466-1439 (elongação CH₃ e CH₂); 1382 (elongação C-NO₂); 1239 (elongação C=S); 858-812 (torção C-H).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₂₁H₂₆N₂O₂S+H⁺]: calculado: 371,1788; experimental 371,1788.

3.3.2.4. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-(4-(octiloxi)fenil)benzotioamida, **4.d**

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. O produto foi purificado (0,581g) através de uma cromatografia em coluna aberta e uma cromatografia em camada fina preparativa. Primeiramente fez-se a cromatografia em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 2 cm e uma altura de fase estacionária de 34 cm) usando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etilo 6,9:3,1. Foram recolhidas 79 frações com aproximadamente 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 26 a 50 foram juntas, num total de 0,205 g, 0,076 g desta junção foram submetidas a uma cromatografia em camada fina preparativa usando como uma fase móvel de hexano/ acetato de etilo 6,9:3,1 tendo-se obtido 0,055 g do produto pretendido com um rendimento do produto purificado de 4,1%.

Estado físico: Óleo amarelo.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 9,88 (s, NH *cis*); 9,10 (s, NH *trans*); 8,00 (d, 1H, 8,16, H3 *trans*); 7,89 (d, 1H, 8,2, H3 *cis*); 7,64 (t, 1H, 7,5, H5 *trans*); 7,58 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,56 (m, 1H, H6 *trans*); 7,52 (m, 1H, H5 *cis*); 7,51 (m, 1H, H4 *trans*); 7,38 (t, 1H, 8,9, H4 *cis*); 7,32 (d, 1H, 7,7, H6 *cis*); 6,92 (d, 2H, 9,0, H3'-H5' *trans*); 6,86 (d, 2H, 9,0, H2'-H6' *cis*); 6,64 (d, 2H, 9,0, H3'-H5' *cis*); 3,96 (t, 2H, 6,6, H1'' *trans*); 3,82 (t, 2H, 6,6, H1'' *cis*); 1,78 (quint, 2H, 7,0, H2'' *trans*); 1,70 (quint, 2H, 7,0, H2'' *cis*); 1,46 (m, 2H, H3'' *trans*); 1,29 (m, 8H, H4'' a H7'' *trans*) 1,29 (m, 10H, H3'' a H7'' *cis*); 0,88 (m, 3H, H8'' *trans*) 0,88 (m, 3H, H8'' *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 198,27 (C=S *cis*); 196,05 (C=S *trans*); 158,11 (C4' *trans*) 158,09 (C4' *cis*); 145,24 (C2 *cis*); 145,01 (C2 *trans*); 139,15 (C1 *trans*); 136,29 (C1 *cis*); 133,69 (C5 *trans*); 133,40 (C5 *cis*); 130,79 (C1' *trans*); 130,50 (C1' *cis*); 129,65 (C4 *trans*); 129,38 (C4 *cis*); 129,02 (C6 *cis*); 128,95 (C6 *trans*); 125,54 (C2'-C6' *trans*); 125,51 (C2'-C6' *cis*); 124,65 (C3 *trans*); 124,52 (C3 *cis*); 114,79 (C3'-C5' *trans*); 114,74 (C3'-C5' *cis*); 68,24 (C1'' *trans*); 68,17 (C1'' *cis*); 31,77 (C6'' *trans*); 31,72 (C6'' *cis*); 29,31 (C5'' *trans*); 29,25 (C5'' *cis*); 29,20 (C4'' *trans*); 29,16 (C4'' *cis*); 29,13 (C2'' *trans*); 29,03 (C2'' *cis*); 25,98 (C3'' *trans*); 25,89 (C3'' *cis*); 22,62 (C7'' *trans*); 22,58 (C7'' *cis*); 14,08 (C8'' *trans*); 14,05 (C8'' *cis*).

¹H-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 12,45 (s, NH *cis*); 12,15 (s, NH *trans*); 8,09 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 7,95 (d, 1H, 7,6, H3 *cis*); 7,80 (m, 1H, H5 *trans*); 7,77 (m, 2H, H2'-H6' *trans*); 7,66 (m, 1H, H4 *trans*); 7,62 (m, 1H, H6 *trans*); 7,61 (m, 1H, H5 *cis*); 7,49 (t, 1H, 7,22, H4 *cis*); 7,27 (d, 1H, 7,7, H6 *cis*); 6,99 (d, 2H, 9,0, H3'-H5' *trans*); 6,93 (d, 2H, 8,9, H2'-H6' *cis*); 6,74 (d, 2H, 9,0, H3'-H5' *cis*); 3,98 (t, 2H, 6,5, H1'' *trans*); 3,83 (t, 2H, 6,5, H1'' *cis*); 1,72 (quint, 2H, 6,9, H2'' *trans*); 1,62 (quint, 2H, 6,9, H2'' *cis*); 1,41 (m, 2H, H3'' *trans*); 1,30-1,27 (m, 8H, H4'' a H7'' *trans*); 1,30-1,27 (m, 10H, e H3'' a H7'' *cis*); 0,86 (m, 3H, H8'' *trans*) 0,86 (m, 3H, H8'' *cis*).

¹³C-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (atribuição)]: 196,54 (C=S *cis*); 192,47 (C=S *trans*); 156,97 (C4' *cis*); 156,89 (C4' *trans*); 145,61 (C2 *cis*); 145,14 (C2 *trans*); 139,06 (C1 *trans*); 137,14 (C1 *cis*); 133,85 (C5 *trans*); 133,72 (C5 *cis*); 132,17 (C1' *trans*); 131,70 (C1' *cis*); 129,70 (C4 *trans*); 129,47 (C4 *cis*); 129,06 (C6 *trans*); 128,07 (C6 *cis*); 125,16 (C2'-C6' *cis*); 124,50 (C2'-C6' *trans*); 124,50 (C3 *cis*); 124,28 (C3 *trans*); 114,54 (C3'-C5' *cis*); 114,28 (C3'-C5' *trans*); 67,66 (C1'' *trans*); 67,55 (C1'' *cis*); 31,26 (C6'' *trans*); 31,22 (C6'' *cis*); 28,76 (C5'' *trans* e C5'' *cis*); 28,70 (C4'' *trans* e C4'' *cis*); 28,66 (C2'' *trans*); 28,57 (C2'' *cis*); 25,54 (C3'' *trans*); 25,46 (C3'' *cis*); 22,11 (C7'' *trans*); 22,08 (C7'' *cis*); 13,98 (C8'' *trans* e C8'' *cis*).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3115,0 (elongação N-H); 2921,9-2855,0 (elongação C-H aromática); 1573,6 (elongação C-C aromática); 1528,8 (elongação NO₂); 1468,7-1440,3 (elongação CH₂ e CH₃); 1388,6 (elongação C-NO₂); 12545,8 (elongação C=S); 831,6-728,6 (torção C-H).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₂₁H₂₆N₂O₂S+H⁺]: calculado: 387,1737; experimental 387,1732.

3.3.2.5. Síntese e caracterização da 2-nitro-*N*-fenilbenzotioamida, 4.e

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. Purificaram-se 0,500 g da mistura reacional através de cromatografia em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 2 cm e uma altura de fase estacionária de 34 cm) usando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel uma mistura de hexano/éter dietílico 4:6. Foram recolhidas 126 frações com aproximadamente 1 mL, que foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 74 a 82 que correspondiam ao produto pretendido cromatograficamente puro foram juntas, tendo-se obtido desta forma 0,178 g de **4.e** com um rendimento do produto purificado de 14,8%.

Estado físico: Sólido amorfo amarelo.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 9,80 (s, NH *cis*); 8,96 (s, NH *trans*); 8,05 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 7,92 (d, 1H, 8,4, H3 *cis*); 7,76 (d, 2H, 7,5, H2'-H6' *trans*); 7,68 (t, 2H, 7,5, H2'-H6' *trans*); 7,60 (d, 1H, 7,6, H6 *trans*); 7,54 (m, 1H, H4 *trans*); 7,52 (m, 1H, H5 *cis*); 7,44 (m, 1H, H6 *cis*); 7,41 (m, 2H, H3'-H5' *trans*); 7,36 (m, 1H, H4 *cis*); 7,33 (m, 1H, H4' *trans*); 7,16 (m, 2H, H3'-H5' *cis*); 7,14 (m, 1H, H4' *cis*); 6,92 (m, 2H, H2'-H6' *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 198,44 (C=S *cis*); 195,30 (C=S *trans*); 145,68 (C2 *cis*); 145,13 (C2 *trans*); 139,34 (C1 *trans*); 138,05 (C1' *trans*); 137,69 (C1' *cis*); 136,27 (C1 *cis*); 133,76 (C5 *trans*); 133,47 (C5 *cis*); 129,81 (C4 *trans*); 129,60 (C3'-C5' *cis*); 129,34 (C3'-C5' *trans*); 129,17 (C6 *trans*); 128,98 (C4 *cis*); 128,95 (C6 *cis*); 127,50 (C4' *trans*); 127,27 (C4' *cis*); 124,76 (C3 *trans*); 124,63 (C3 *cis*); 123,76 (C2'-C6' *trans*); 123,64 (C2'-C6' *cis*).

¹H-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 12,64 (s, NH *cis*); 12,30 (s, NH *trans*); 8,10 (d, 1H, 8,2, H3 *trans*); 7,97 (d, 1H, 7,3, H3 *cis*); 7,88 (d, 2H, 7,6, H2'-H6' *trans*); 7,81 (t, 1H, 7,8, H5' *trans*); 7,68 (m, 1H, H4 *trans*); 7,65 (m, 1H, H6 *trans*); 7,60 (m, 1H, H5 *cis*); 7,53 (m, 1H, H4 *cis*); 7,47 (m, 2H, H3'-H5' *trans*); 7,31 (m, 1H, H4' *trans*); 7,27 (m, 1H, H6 *cis*); 7,22 (m, 2H, H3'-H5' *cis*); 7,13 (t, 1H, 7,3, H4' *cis*); 7,00 (m, 2H, H2'-H6' *cis*).

¹³C-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (atribuição)]: 196,13 (C=S *cis*); 193,60 (C=S *trans*); 145,06 (C2 *trans*); 139,23 (C1 *trans*); 139,08 (C1' *trans*); 138,76 (C1' *cis*); 137,10 (C1 *cis*); 133,94 (C5 *trans*); 133,79 (C5 *cis*); 129,81 (C4 *trans*); 129,64 (C4 *cis*); 129,08 (C6 *trans*); 129,04 (C3'-C5' *cis*); 128,76 (C3'-C5' *trans*); 127,92 (C6 *cis*); 126,60 (C4' *trans*); 126,46 (C4' *cis*); 124,61 (C3 *cis*); 124,33 (C3 *trans*); 123,52 (C2'-C6' *cis*); 123,03 (C2'-C6' *trans*).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3108,4 (elongação N-H), 2955,3-2894,3 (elongação C-H aromática), 1591,3 (elongação C-C aromática), 1525,8 (elongação NO₂), 1336,4 (elongação C-NO₂), 1170,0 (elongação C=S), 856,3-638,3 (torção C-H).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₁₃H₁₀N₂O₂S+H⁺]: calculado: 259,0536; experimental 259,2529.

3.3.2.6. Síntese e caracterização da *N*-(4-octilfenil)-2-(trifluorometil)benzotioamida,

4.f

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. Purificaram-se cerca de 0,600 g da mistura reacional através de cromatografia em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 4 cm e uma altura de fase estacionária de 17 cm) usando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etilo 8,5:1,5. Foram recolhidas 171 frações com aproximadamente 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 41 a 70 que correspondiam ao produto pretendido, mas ainda com impurezas, foram reunidas e recromatografadas em coluna aberta nas mesmas condições que a primeira cromatografia, mas usando como fase móvel hexano/acetato de etilo 7:3. Foram recolhidas 100 frações com aproximadamente com 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 33 a 100 que correspondiam ao produto pretendido cromatograficamente puro foram reunidas, tendo-se obtido 0,194 g de **4.f** com um rendimento do produto purificado de 37,3%.

Estado físico: Sólido amorfo amarelo.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, J, atribuição)]: 9,64 (s, NH *cis*); 8,76 (s, NH *trans*); 7,70 (m, 2H, 8,2, H3 e H6 *trans*); 7,64 (3, 2H, H2'-H5' *trans*); 7,61 (d, 1H, H5 *trans*); 7,51 (t, 1H, 7,8, H4 *trans*); 7,47 (d, 1H, 7,5, H5 *cis*); 7,41 (t, 1H, 7,6, H6 *cis*); 7,33 (d, 1H, 7,5, H4 *cis*); 7,26 (m, 2H, H3'-H5' *trans*); 6,95 (d, 2H, 8,4, H3'-H5' *cis*); 6,67 (d, 2H, 8,4, H2'-H6' *cis*); 2,63 (t, 2H, 7,6, H1'' *cis*); 2,47 (t, 2H, 7,6, H1'' *cis*); 1,62 (quint, 2H, 7,3, H2'' *trans*); 1,49 (m, 2H, H2'' *cis*); 1,29 (m, 10H, H3'' a H7'' *trans*); 1,29 (m, 10H, H3'' a H7'' *cis*); 0,87 (m, 3H, H8'' *trans*) 0,87 (m, 3H, H8'' *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 196,62 (C=S *trans*); 142,75 (C1 *trans* e C1 *cis*); 142,74 (C4' *trans*); 142,00 (C4' *cis*); 135,88 (C1' *trans* e C1' *cis*); 132,17 (C5 *trans*); 131,67 (C5 *cis*); 130,03 (C6 *trans*); 129,27 (C4 *trans*); 129,02 (C3'-C5' *trans* e C3'-C5' *cis*); 128,81 (C6 *cis*); 128,42 (C4 *cis*); 126,99-126,84 (C3 *cis*); 126,32-126,17 (C3 *cis*); 123,41 (C2'-C6' *trans*); 122,63 (C2'-C6' *cis*); 36,63 (C1'' *trans*); 36,21 (C1'' *cis*); 31,87 (C6'' *trans*); 31,79 (C6'' *cis*); 31,34 (C2'' *trans*); 31,04 (C2'' *cis*); 29,45 (C5'' *trans*); 29,33 (C5'' *cis*); 29,30 (C4'' *trans*); 29,27 (C3'' *trans*); 29,17 (C3'' *cis*); 29,08 (C4'' *cis*); 22,67 (C7'' *trans* e C7'' *cis*); 14,10 (C8'' *trans* e C8'' *cis*). (Anexo 98 a Anexo 102).

IV (KBr) ν_{máx}/ cm⁻¹: 3170,7 (elongação N-H), 31086,6-2854,0 (elongação C-H aromático), 1509,8 (elongação C-C aromática), 1374,3 (elongação CH₂ e CH₃), 1312,8 (elongação C-F), 1125,6 (elongação C=S), 731,4-660,71 (torção C-H). (Anexo 103).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₂₂H₂₆F₃NS+H⁺]: calculado: 394,1811; experimental 394,1812. (Anexo 104).

3.3.2.7. Síntese e caracterização da N-fenil-2-(trifluorometil)benzotioamida, 4.h

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. Purificaram-se cerca de 0,157 g da mistura reacional através de duas cromatografia em camada fina preparativa. As c.c.f.p. foram eluidas com um eluente de hexano/acetato de etilo 8:2 tendo-se obtido 0,077 g do produto pretendido com um rendimento do produto purificado de 20,8%.

Estado físico: Óleo amarelo. (num total de 0,157g).

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 9,69 (s, NH *cis*); 8,80 (s, NH *trans*); 7,76 (d, 2H, 7,9, H2'-H6' *trans*); 7,70 (d, 2H, 8,0, H3 *trans* e H6 *trans*); 7,61 (t, 1H, H5 *trans*); 7,52 (t, 1H, 7,6, H4 *trans*); 7,46 (t, 2H, 7,6, H3'-H5' *trans*); 7,33 (t, 1H, H4' *trans*); 7,14 (m, 3H, H3'-H5' *cis* e H4' *cis*); 6,77 (d, 2H, 7,6, H2'-H6' *cis*).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 196,98 (C=S *trans*); 142,74 (C1' *trans*); 138,24 (C1 *trans*); 132,20 (C5 *trans*); 130,01 (C6 *trans*); 129,34 (C4 *trans*); 129,19 (C3'-C5' *trans*); 128,93 (C3'-C5' *cis*); 127,41 (C4' *trans*); 126,65 (C4' *cis*); 126,35-126,19 (C3 *trans*); 123,56 (C2-C6' *trans*); 122,75 (C2'-C6' *cis*). (Anexo 105 a Anexo 109).

IV (KBr) ν_{máx}/ cm⁻¹: 3107,1 (elongação N-H), 2994,0-2885,0 (elongação C-H aromático), 1594,3 (elongação C-C aromática), 11313,1 (elongação C-F), 1175,2 (elongação C=S), 770,5 (elongação CF₃), 700,5-342,2 (torção C-H). (Anexo 110).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₁₄H₁₀F₃NS+H⁺]: calculado: 282,0559; experimental 282,0545. (Anexo 111).

3.3.2.8. Síntese e caracterização da N-(4-fenoxifenil)benzotioamida, 4.j

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. Purificaram-se cerca de 0,500 g da mistura reacional através de cromatografia em coluna aberta (diâmetro interno da coluna 2 cm e uma altura de fase estacionária de 26,5 cm) usando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um mistura de hexano/acetato de etilo 8,1:1,95. Foram recolhidas 86 frações com aproximadamente 1 mL. As frações foram agrupadas de acordo com o seu comportamento em c.c.f.. As frações 13 a 68 que correspondiam ao produto pretendido cromatograficamente puro foram reunidas tendo-se obtido 0,351 g de **4.j** com um rendimento do produto purificado de 55,8%.

¹H-RMN [CDCl₃, δ/ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 9,01 (s, NH); 7,85 (d, 2H, 7,3, H6 e H2); 7,70 (d, 2H, 8,8, H2'-H6'); 7,51 (t, 1H, 7,3, H5); 7,44 (t, 2H, 7,4, H4 e H3); 7,37 (t, 2H, 7,9, H3''-H5''); 7,15 (t, 1H, 7,4, H4''); 7,05 (m, 4H, H3'-H5' e H2''-H6'').

¹³C-RMN [CDCl₃, δ/ppm (atribuição)]: 198,33 (C=S); 156,56 (C1''); 155,90 (C4'); 142,93 (C1); 133,97 (C1'); 131,13 (C4 e C3); 129,85 (C3''-C5''); 128,64 (C5); 126,65 (C6); 125,44 (C2'-C6'); 123,74 (C4''); 119,28 (C2''-C6'') 118,72 (C3'-C5'). (Anexo 112 a Anexo 116).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3176,9 (elongação N-H), 3046,1 (elongação C-H aromática), 1587,7 (elongação C-C aromática), 1519,7 (elongação NO₂) 1488,1 (elongação C-N), 1355-9 (elongação C-NO₂), 1166,9 (elongação C=S), 1102,9 (elongação C-O-C), 817,4-619,4 (torção C-H). (Anexo 117).
HRMS (ESI(+), m/z) [C₁₉H₁₅NOS+H⁺]: calculado: 306,0947; experimental 306,0940. (Anexo 118).

3.3.3.0. Síntese e caracterização da *N*-(4-octilfenil)benzotioamida, **4.1**

Seguiu-se o procedimento geral descrito no ponto 3.3.2. O produto foi purificado (num total de 0,200g) através de duas cromatografia em camada fina preparativa. Eluíram-se as c.c.f.p. com um eluente de hexano/acetato de etilo 9:1 e obteve-se 0,055 g do produto pretendido com um rendimento do produto purificado de 41,9%.

Estado físico: Óleo amarelo.

¹H-RMN [CDCl₃, δ /ppm (multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição)]: 8,98 (s, NH); 7,67 (d, 2H, 8,2, H2'-H6'); 7,50 (m, 1H, H4); 7,45 (m, 2H, H3 e H5); 7,25 (m, 2H, H3'-H5'); 2,63 (t, 2H, H1'); 1,61 (m, 1H, H2''); 1,31 (m, 10H, H3'' a H7''); 0,87 (m, 3H, H8).

¹³C-RMN [CDCl₃, δ /ppm (atribuição)]: 198,09 (C=S); 143,26 (C1); 142,06 (C4'); 136,61 (C1'); 131,20 (C4); 128,95 (C3'-C5'); 128,65 (C3 e C5); 126,63 (C2 e C6); 123,54 (C2'-C6'); 36,61 (C1''); 31,87 (C6''); 31,48 (C2''); 29,45 (C3''); 29,29 (C5''); 29,24 (C4''); 22,66 (C7''); 14,81 (C8''). (Anexo 125 a Anexo 129).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3106,9 (elongação C-H); 2994,1-2957,6 (elongação C-H aromática); 1530,4 (elongação C-C aromática); 1495,2 (elongação NO₂); 1446,2 (elongação CH₃ e CH₂); 1372,3 (elongação C-NO₂); 1239,5 (elongação C=S) 858,2-812,1 (torção C-H). (Anexo 130).

HRMS (ESI(+), m/z) [C₂₁H₂₇NS+H⁺]: calculado: 326,1937; experimental 326,1932. (Anexo 131).

3.4. Cultura Celular

As células das duas linhas celulares, A375 e MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina em frascos de 25 cm² (T25) ou de 75 cm² (T75) e, incubadas numa incubadora (SANYO O₂/CO₂ Incubator) num ambiente húmido a 37°C com 5% de CO₂. A cada 48h-72h o meio de cultura foi renovado. Quando as células se encontravam com uma confluência de 80%, observada ao microscópio óptico, foram tripsinizadas, lavando-se inicialmente com uma solução de PBS 1× e, em seguida, as células foram incubadas nas mesmas condições referidas em cima durante 3 a 5 minutos. Uma suspensão de células foi contada no hemacitómetro (*Superior Marienfeld Germany Neubauer improved*), usando uma solução de 0,4% m/v de azul de tripano para analisar a viabilidade celular. Posteriormente, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços colocando 100 µM por poço de uma suspensão de células em meio de cultura. Para a linha celular A375 foram utilizadas cerca de 20× 10⁴ células/mL e para as MCF-7 utilizaram-se cerca de 50× 10⁴ células/mL.

3.5. Ensaios de viabilidade

Nos ensaios citotóxicos utilizou-se o método colorimétrico de MTT usando o procedimento geral descrito em ⁷⁷. As microplacas de 96 poços preparadas e incubadas, como descrito em 3.4, até 100% de confluência durante aproximadamente 72h.

As soluções dos derivados da tiobenzanilida foram preparadas em diferentes concentrações em meio de DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina contendo 0,5% de DMSO para permitir a sua solubilização.

Os compostos foram colocados em contacto com as células durante 24 horas e em seguida retiraram-se as soluções dos compostos e lavaram-se os poços duas vezes com uma solução de PBS 1×, para contornar o problema da redução química que poderia surgir com a existência de tiobenzanilidas não metabolizadas⁷². Adicionou-se 100 µL de uma solução de 0,5 mg/mL de MTT em DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina e incubou-se cerca de 3 horas. Posteriormente retirou-se a solução e dissolveram-se os cristais de formazan em 100 µL de metanol. Após os cristais estarem dissolvidos leram-se as absorvâncias a 595 nm contra 630 nm no leitor de microplacas (TECAN Sunrise A-502). Foi realizado o mesmo procedimento para ensaios controlo em que as células foram incubadas 24h com uma solução controlo positivo contendo SDS 1 mg/mL (100% de morte celular) e uma solução controlo negativo de DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina com 0,5% de DMSO correspondendo a 0% de morte celular. Para cada concentração foram realizados um mínimo de oito replicados. Os resultados obtidos permitiram calcular a percentagem de citotoxicidade das soluções de diferentes concentrações de derivados da tiobenzanilida utilizados. Calculou-se a viabilidade celular para cada concentração utilizada a partir do rácio entre a absorvância registada em cada poço relativamente ao valor médio da absorvância nos poços do controlo negativo. A citotoxicidade foi calculada usando a seguinte expressão: $\frac{(100 - (Abs_{ensaio} \times 100))}{Abs_{controlo\ negativo}}$. Com os valores de citotoxicidade foram construídas as curvas dose-resposta no programa *GraphPad Prim 5.0*, as quais relacionam as concentrações das tiobenzanilidas testadas com as percentagens de morte celular calculadas. No entanto, no caso dos compostos **4.m, 4.n, 4.q** e a doxorubicina, para os quais os resultados dos ensaios neste programa foram inconclusivos, utilizou-se o *Microsoft Excel* para determinar os EC50 (não sendo possível calcular os outros parâmetros). A partir dos dados analisados foi possível determinar o EC50 e também foram retirados os valores do limite inferior, último valor de concentração no patamar inferior, e limite superior, primeiro valor de concentração do patamar superior. Os desvios à média foram calculados no *Microsoft Excel* e são referentes à amplitude da variação entre os valores de $10^{\log EC50 + SD}$ e $10^{\log EC50 - SD}$. Sendo que o SD é o valor de desvio padrão retirado do *GraphPad Prim 5.0*.

Os erros relativos foram calculados pela divisão do desvio à média de cada composto pelo seu EC50 multiplicando por 100.

A doxorubicina e o tamoxifen foram utilizados como fármacos de referência de mercado para o melanoma maligno da pele e o cancro da mama hormono-dependente, respetivamente.

4. Conclusão

A finalidade do presente trabalho foi criar uma pequena biblioteca de derivados de tiobenzanilidas e avaliar as suas atividades anticancerígenas nas linhas celulares A375 e MCF-7 obtendo assim informação para a realização de estudos de SAR, de forma a correlacionar a atividade anticancerígena com determinadas características estruturais.

Neste trabalho sintetizaram-se com sucesso cinco novos derivados da tiobenzanilida (**4.a-4.e**) utilizando uma via reacional de dois passos, que compreendeu a síntese das benzanilidas correspondentes e posterior tionação com o LR. Ressintetizaram-se igualmente quatro compostos que já tinham sido sintetizados em trabalhos anteriores (**4.f**, **4.h**, **4.j** e **4.l**). Todos os compostos foram extensivamente caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN mono e bidimensionais e IV, HRMS, tendo sido também utilizada a difração de RX para um composto (**4.a**).

Verificou-se que em solução todas as tiobenzanilidas existiam como um equilíbrio entre os dois rotâmeros *cis* e *trans* à volta da ligação tioamida. Constatou-se igualmente que a proporção entre os dois rotâmeros era fortemente dependente da natureza do solvente deuterado utilizado: para solventes como o CDCl_3 e o C_6H_6 o rotâmero *trans* é fracamente maioritário, para solventes como o $\text{DMSO}-d_6$ e o $\text{THF}-d_8$ o rotâmero *cis* surge numa proporção muito baixa, possivelmente devido aos elevados momentos dipolares dos solventes provocando um aumento da barreira rotacional impedindo assim a rotação da ligação $\text{C}(=\text{S})\text{-N}$. Este equilíbrio também depende da natureza dos grupos da posição *orto*, em relação ao tiocarbonilo, do anel benzofílico. Quando se substitui a posição 2 com o grupo NO_2 este equilíbrio é muito marcado, aparecendo o rotâmeros *cis* numa grande proporção, no entanto com o substituinte 2-CF_3 este equilíbrio não foi significativamente relevante. Quando a posição 2 não estava substituída o equilíbrio não se observou.

A maioria das tiobenzanilidas testadas nos ensaios de citotoxicidade na linha celular A375 apresentaram valores de EC_{50} muito promissores enquadrando-se em concentrações na ordem dos μM . A família de compostos com dois grupos NO_2 nas posições 3,5 foi, regra geral, a que apresentou melhores atividades citotóxicas. Por comparação do EC_{50} das tiobenzanilidas substituídas com o EC_{50} da tiobenzanilida sem nenhum substituinte (**4.n**), superior a $100 \mu\text{M}$, concluiu-se que todas as substituições foram positivas, diminuindo drasticamente o EC_{50} , excetuando nas tiobenzanilidas **4.m** e **4.q** que apresentaram EC_{50} maiores que o composto **4.n**. Verificou-se que a atividade anticancerígena é dependente, em simultâneo, das substituições do anel benzofílico e no anel anilínico. Os compostos que se mostraram mais promissores foram o **4.h**, com um EC_{50} de $26,1 \mu\text{M}$, e o **4.r**, cujo EC_{50} foi o mais baixo ($11,8 \mu\text{M}$). O composto **4.r** apresentou um valor muito próximo ao da doxorubicina ($6,0 \mu\text{M}$).

Na linha celular MCF-7 foram apenas testados os compostos **4.c**, **4.f** e **4.q** tendo-se obtido apenas resultados preliminares. No entanto os valores do EC_{50} preliminares são prometedores, na medida em que são da mesma ordem de grandeza do valor obtido para o próprio tamoxifen, um dos fármacos utilizados para tratar este tipo de cancro, principalmente o composto **4.c**.

Quanto às perspectivas futuras para a continuação deste trabalho propõe-se:

- Fazer alguns cálculos teóricos de modo a entender o porquê do surgimento de um equilíbrio conformacional em algumas tiobenzanilidas;
- Completar os ensaios de citotoxicidade para a linha celular MCF-7;
- Estudar o mecanismo de ação dos compostos mais promissores em ambas as linhas celulares para tentar perceber o mecanismo de morte celular nas linhas celulares testadas;
- Avaliar a citotoxicidade destes compostos em linhas celulares saudáveis de modo a verificar se estes compostos são seletivos para células cancerígenas;
- Fazer estudos de permeabilidade celular.

5. Bibliografia

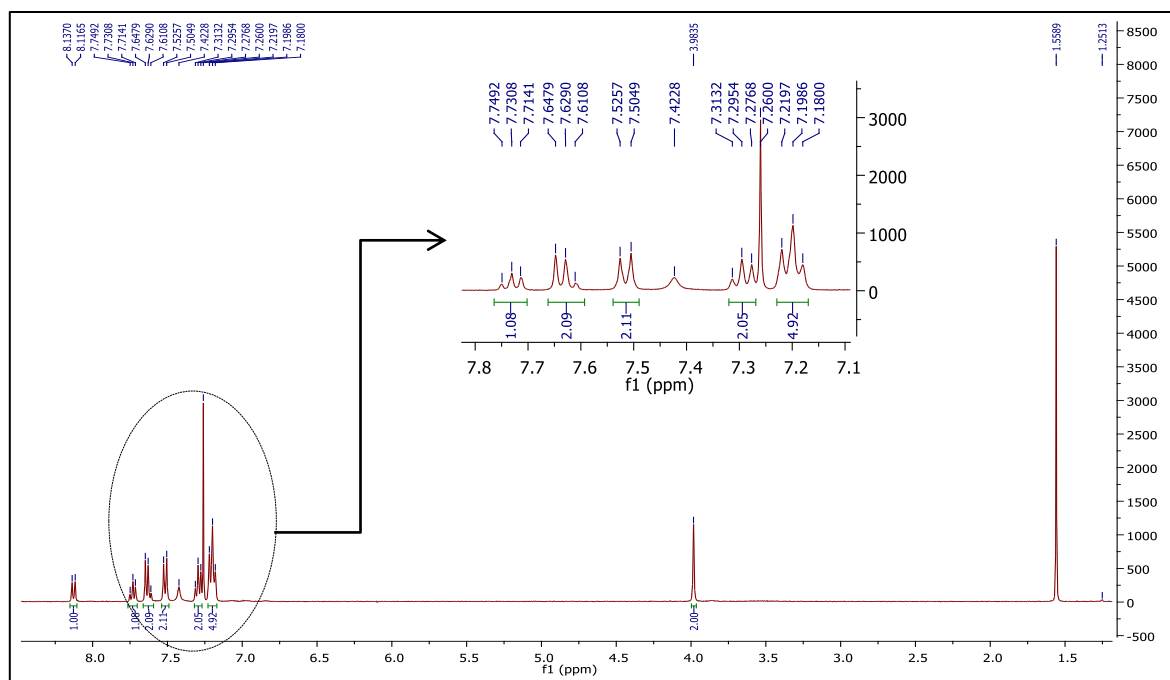
- (1) Bhuva, H. A.; Kini, S. G. Synthesis , Anticancer Activity and Docking of Some Substituted Benzothiazoles as Tyrosine Kinase Inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, 29 (1), 32–37.
- (2) <https://www.cancer.gov>, Consultado a 23/04/2017.
- (3) <http://www.who.int/cancer/en/>, Consultado a 15/04/2017.
- (4) Global Status Report on Noncommunicable Diseases. *Word Heal. Organ.* **2014**.
- (5) Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J. Global Cancer Statistics , 2012. **2015**, 65 (2), 87–108.
- (6) American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. **2016**, No. 5, 72.
- (7) <http://globocan.iarc.fr>, Consultado a 18/07/2017.
- (8) Allardyce, B. C. S.; Dyson, P. J. Ruthenium in Medicine : Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platin. Met. Rev.* **2001**, 45 (2), 62–69.
- (9) Chambers, A. F.; Groom, A. C.; Macdonald, I. C. Dissemination and Growth of Cancer Cellas in Metastatic Sites. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2 (August 2002), 563–572.
- (10) <http://www.cancerresearchuk.org>, Consultado a 30/07/2017.
- (11) <https://www.ligacontracancro.pt/>, Consultado a 23/07/2017.
- (12) Oh, D. S.; Troester, M. A.; Usary, J.; Hu, Z.; He, X.; Fan, C.; Wu, J.; Carey, L. A.; Perou, C. M. Estrogen-Regulated Genes Predict Survival in Hormone Receptor-Positive Breast Cancers. *J. Clin. Oncol.* **2006**, 24 (11), 1656–1664.
- (13) Renoir, J.-M.; Marsaud, V.; Lazennec, G. Estrogen Receptor Signaling as a Target for Novel Breast Cancer Therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, 85, 449–465.
- (14) Kucinska, M.; Giron, M.; Piotrowska, H.; Lisiak, N. Novel Promising Estrogenic Receptor Modulators : Cytotoxic and Estrogenic Activity of Benzanilides and Dithiobenzanilides. *PLoS One* **2016**, 1, 1–16.
- (15) Bardou, V. J.; Arpino, G.; Elledge, R. M.; Osborne, C. K.; Clark, G. M. Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21 (10), 1973–1979.
- (16) Osborne, C. K. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 339 (22), 1609–1618.
- (17) Goetz, M. P.; Kamal, A.; Ames, M. M. Tamoxifen Pharmacogenomics: The Role of CYP2D6 as a Predictor of Drug Response. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, 83 (1), 160–166.
- (18) Jin, Y.; Desta, Z.; Stearns, V.; Ward, B.; Ho, H.; Lee, K. H.; Skaar, T.; Storniolo, A. M.; Li, L.; Araba, A.; et al. CYP2D6 Genotype, Antidepressant Use, and Tamoxifen Metabolism during Adjuvant Breast Cancer Treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, 97 (1), 30–39.
- (19) Ring, A.; Dowsett, M. Mechanisms of Tamoxifen Resistance. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, 11 (4), 643–658.
- (20) Viedma-Rodríguez, R.; Baiza-Gutman, L.; Salamanca-Gómez, F.; Diaz-Zaragoza, M.; Martínez-Hernández, G.; Esparza-Garrido, R. R.; Velázquez-Flores, M. A.; Arenas-Aranda, D. Mechanisms Associated with Resistance to Tamoxifen in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer (Review). *Oncol. Rep.* **2014**, 32 (1), 3–15.
- (21) Luqmani, Y. A.; Alam-Eldin, N. Overcoming Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: New Approaches to a Nagging Problem. *Med. Princ. Pract.* **2016**, 25 (2), 28–40.
- (22) <http://www.skincancer.org/>, Consultado a 30/07/2017.
- (23) <https://www.drugs.com/sfx/doxorubicin-side-effects.html>, Consultado a 31/07/2017.
- (24) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1845 (1), 84–89.
- (25) Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C. R. Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, 65 (2), 157–170.
- (26) Sinha, B. K.; Mason, R. Is Metabolic Activation of Topoisomerase II Poisons Important In The Mechanism Of Cytotoxicity? *J. Drug Metab. Toxicol.* **2015**, 6 (3), 186.
- (27) Nitiss, J. Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9

- (5), 338–350.
- (28) Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, R. Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genomics* **2012**, 21 (7), 440–446.
 - (29) Vin, J. Conformations , Equilibrium Thermodynamics and Rotational Barriers of Secondary Thiobenzanilides. *Tetrahedron* **2016**, 72, 2072–2083.
 - (30) Bogdanov, B.; Petrov, I. A Study of Cis - Trans Isomerism of Benzalide and Thiobenzanilide. *Spectrosc. Lett.* **1992**, 25 (2), 37–41.
 - (31) Wiberg, K. B.; Rablen, P. R. Why Does Thioformamide Have a Larger Rotational Barrier Than Formamide? *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (8), 2201–2209.
 - (32) Neuman, R. C.; Roark, D. N.; Jonas, V. Studies of Chemical Exchange by Nuclear Magnetic Resonance. II. Hindered Rotation in Amides and Thioamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (14), 3412–3416.
 - (33) Wiberg, K. B.; Rush, D. J. Solvent Effects on the Thioamide Rotational Barrier: An Experimental and Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (9), 2038–2046.
 - (34) Galabov, B.; Ilieva, S.; Hadjieva, B.; Dinchova, E. On the Origin of Higher Rotational Barriers in Thioamides than in Amides. Remote Substituent Effects on the Conformational Stability of the Thioamide Group in Thioacetanilides. *J. Phys. Chem.* **2003**, 107 (30), 5854–5861.
 - (35) Clayden, J. Conformational Communication between the Ar – CO and Ar – N Axes in 2 , 2 - Disubstituted Benzanilides and Their Derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2106–2118.
 - (36) Chabaud, L.; Clayden, J.; Helliwell, M.; Page, A.; Raftery, J.; Vallverdú, L. Conformational Studies of Tertiary Oligo- M -Benzanilides and Oligo- P -Benzanilides in Solution. *Tetrahedron* **2010**, 66 (34), 6936–6957.
 - (37) Degani, A. L. G. Rotational Features of Carbon-Nitrogen Bonds in Axially Chiral. *Tetrahedron* **1997**, 8 (23), 3955–3975.
 - (38) Waisser, Karel, Palát, Karel, Exner, O. Substituent Effects on Conformational Equilibria: Substituted Thiobenzanilides. *Collect. Czech.Chem.Comm.* **1999**, 64, 1295–1306.
 - (39) Hallam, H. E.; Jones, C. M. Conformational Isomerism of the Amide Group- a Review of the IR and NMR Spectroscopic Evidence. *J. Mol. Struct.* **1970**, 5, 1–19.
 - (40) Ach, D.; Reboul, V.; Metzner, P. Benzylic Metallation of Thiobenzamides and Thionaphthamides. *European J. Org. Chem.* **2002**, No. 15, 2573–2586.
 - (41) Brunhofer, G.; Handler, N.; Leisser, K.; Studenik, C. R.; Erker, T. Benzanilides with Spasmolytic Activity: Chemistry, Pharmacology, and SAR. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, 16 (11), 5974–5981.
 - (42) Brunhofer, G.; Granig, W. H.; Studenik, C. R.; Erker, T. A Journey from Benzanilides to Dithiobenzanilides : Synthesis of Selective Spasmolytic Compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19 (2), 994–1001.
 - (43) Horikoshi, Y.; Chikazawa, J.; Fukuda, Y.; Sato, H. Synthesis of Benzanilide Derivatives as Dual Acting Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2967–2972.
 - (44) Biagi, G.; Giorgi, I.; Livi, O.; Nardi, A.; Calderone, V.; Martelli, A.; Martinotti, E.; Salerni, O. L. R. Synthesis and Biological Activity of Novel Substituted Benzanilides as Potassium Channel Activators. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39 (6), 491–498.
 - (45) Matysiak, J.; Karczewski, J.; Niewiadomy, A. N-Heterocyclic Derivatives of 2 , 4- Dihydroxybenzcarbothioamide as Antimycotic Agents. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 46 (11), 5251–5257.
 - (46) Kozic, J.; Novotná, E.; Volková, M.; Stolaříková, J.; Trejtnar, F.; Vinšová, J. Synthesis and in Vitro Antimycobacterial Activity of 2-Methoxybenzanilides and Their Thioxo Analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 56, 387–395.
 - (47) Brunhofer, G.; Studenik, C.; Ecker, G. F.; Erker, T. Synthesis, Spasmolytic Activity and Structure – Activity Relationship Study of a Series of Polypharmacological Thiobenzanilides. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, 42, 37–44.
 - (48) Hu, W.; Yu, H.; Chen, Y.; Tsai, Y.; Chen, Y. Synthesis and Biological Evaluation of Thiobenzanilides as Anticancer Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 5295–5302.
 - (49) Kucinska, M.; Piotrowska-Kempisty, H.; Lisiak, N.; Kaczmarek, M.; Dams-Kozłowska, H.; Granig, W. H.; Höferl, M.; Jäger, W.; Zehl, M.; Murias, M.; et al. Selective Anticancer

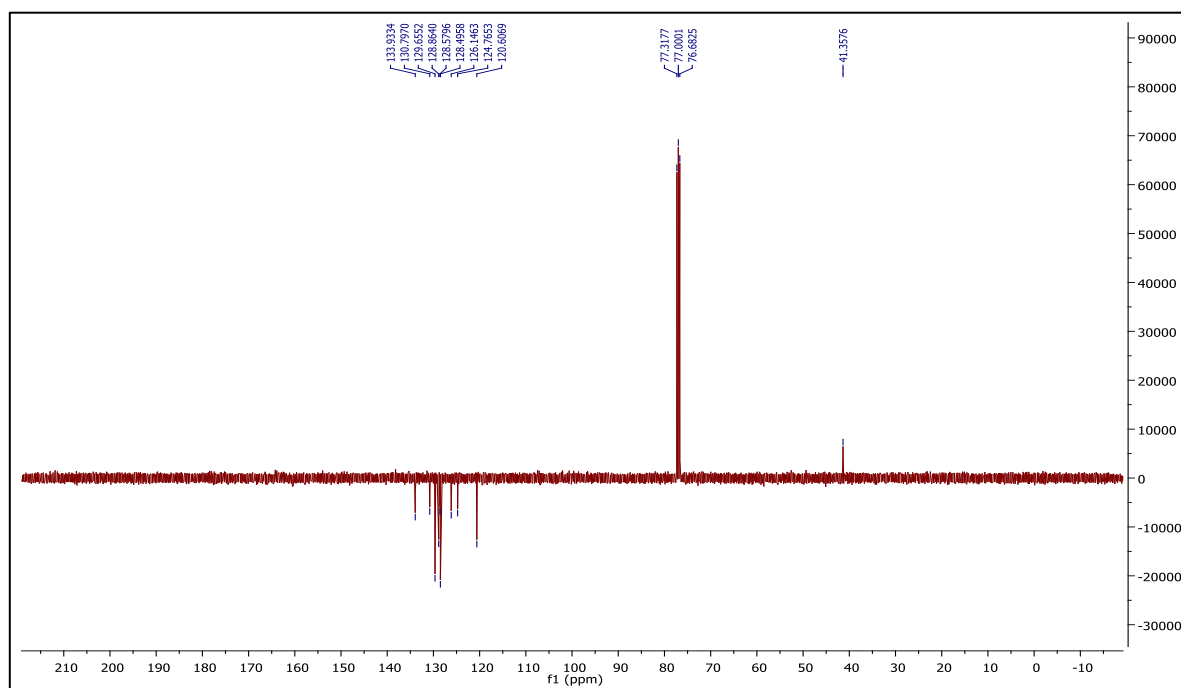
- Activity of the Novel Thiobenzanilide 63T against Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Toxicol. Vitro*. **2016**, 37, 148–161.
- (50) Waisser, K.; Hounghedji, N.; Macl, M.; Sekera, M.; Urban, J.; Odlerova, Z. Antimycobacterial Thiobenzanilides. *Collect. Czech.Chem.Communic.* **1990**, 55, 307–316.
 - (51) Kuneš, J.; Balšánek, V.; Pour, M.; Waisser, K.; Kaustová, J. On the Relationship between the Substitution Pattern of Thiobenzanilides and Their Antimycobacterial Activity. *Farm.* **2002**, 57 (9), 777–782.
 - (52) Matysiak, J.; Niewiadomy, A.; Mącik-Niewiadomy, G. In Vitro Inhibition Properties of a New Group of Thiobenzanilides in Relation to Yeasts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 10 (2), 119–123.
 - (53) Wenlock, M. C.; Austin, R. P.; Barton, P.; Davis, A. M.; Leeson, P. D. A Comparison of Physicochemical Property Profiles of Development and Marketed Oral Drugs. *J. Med. Chem.* **2003**, 46 (7), 1250–1256.
 - (54) McKinney, J. D.; Richard, A.; Waller, C.; Newman, M. C.; Gerberick, F. The Practice of Structure Activity Relationships (SAR) in Toxicology. *Toxicol. Sci.* **2000**, 56 (1), 8–17.
 - (55) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V.; Park, M.; Ox, A. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (740), 10827–10852.
 - (56) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry*, 6^a Edição.; A John Wiley & Sons, I. P., Ed.; **2001**; Volume 6, pag. 1411.
 - (57) Paulo, S. P. *Química Orgânica- Volume 2*, 1^a Edição.; Press; **2012**.
 - (58) Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (11), 5210–5278.
 - (59) Polshettiwar, Vivek, Kaushik, M. P. Recent Advances in Thionating Reagents for the Synthesis of Organosulfur Compounds. *J. Sulfur Chem.* **2007**, 27 (4), 353–386.
 - (60) Rauter, Amélia Pilar, Fernandes, Ana Cristina, Herold, Bernardo, Maia, Hernâni, Rodrigues, J. A. R. *Guia Para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*, 1^a Edição; Lidel, Lisboa; **2002**.
 - (61) <https://www.chem.wisc.edu>, Consultado a 21/09/2017.
 - (62) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3^a Edição.; Wiley-VCH, Ed.; **2003**.
 - (63) Sittampalam, G.; Coussens, N.; Arkin, M.; Auld, D.; Austin, C.; Bejcek, B.; Glicksman, M.; Inglese, J.; Iversen, P.; McGee, J.; et al. *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly; **2016**.
 - (64) Twentyman, P.; Luscombe, M. A Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity. *Br. J. Cancer* **1987**, 56 (3), 279–285.
 - (65) Slater, T. F.; Sawyer, B.; Sträuli, U. Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 77, 383–393.
 - (66) Stockert, J. C.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R. W.; Villanueva, Á. MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets. *Acta Histochem.* **2012**, 114 (8), 785–796.
 - (67) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65 (1–2), 55–63.
 - (68) Nikkhah, G.; Tonn, J. C.; Hoffmann, O.; Kraemer, H.-P.; Darling, J. L.; Schackenmayr, W.; Schönmayr, R. . The MTT Assay for Chemosensitivity Testing of Human Tumors of the Central Nervous System Part II: Evaluation of Patient- and Drug-Specific Variables. *J. Neurooncol.* **1992**, 13, 13–24.
 - (69) Shearman, M. S.; Hawtin, S. R.; Taylor, V. J. The Intracellular Component of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction Is Specifically Inhibited by β -Amyloid Peptides. *J. Neurochem.* **1995**, 65 (1), 218–227.
 - (70) Berridge, Michael V., Tan, A. S. Characterization Of the Cellular Reduction of 3- (4,5-Dimethylthiazol-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 303 (31), 474–482.
 - (71) Liu, Y.; Peterson, D. A.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* **2002**, 69 (2), 581–593.
 - (72) Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII.

- Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2003**, 55 (4), 597–606.
- (73) Motulsky, H. C. A. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*; New York, **2004**.
- (74) Armarego, W. L. .; Perrin, D. . *Purification of Laboratory Chemicals*, 4^a Edição.; Press, P., Ed.; 1997; Vol. 2.
- (75) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (14), 2923–2925.
- (76) Pretsch, E.; Buhlmann, P.; Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds*, 4^a Edição.; Springer, Ed.; **2008**; Capítulo 4 e 5.
- (77) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* **2004**, 740, 33–43.

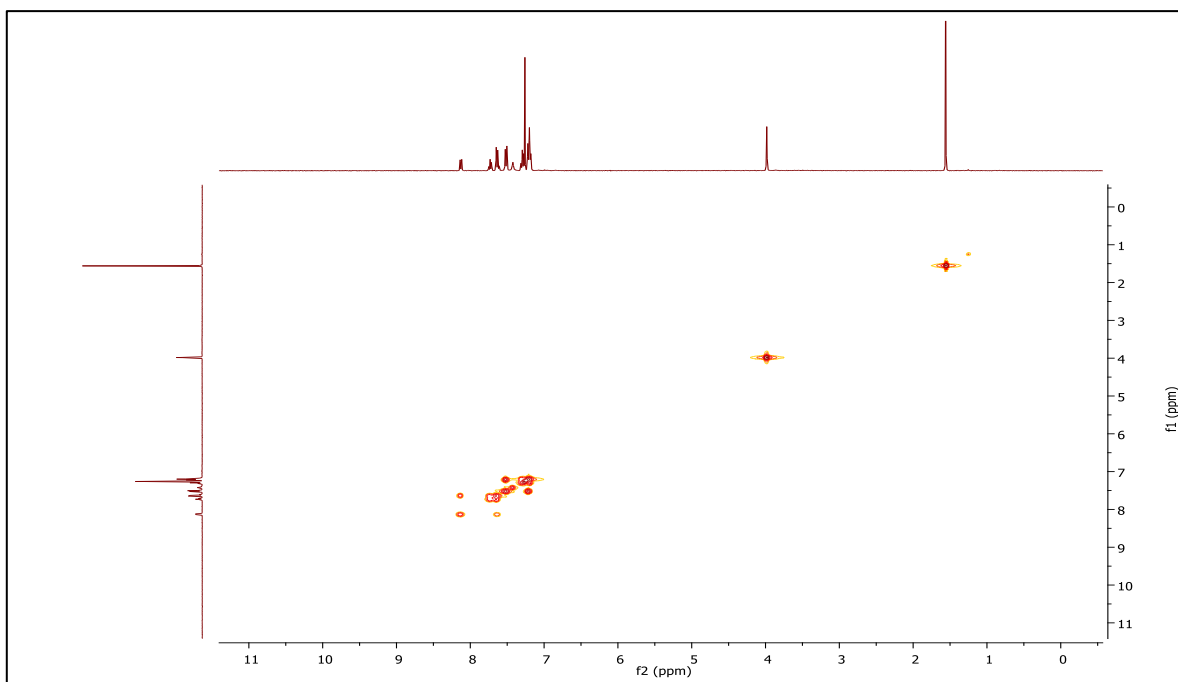
6. Anexos



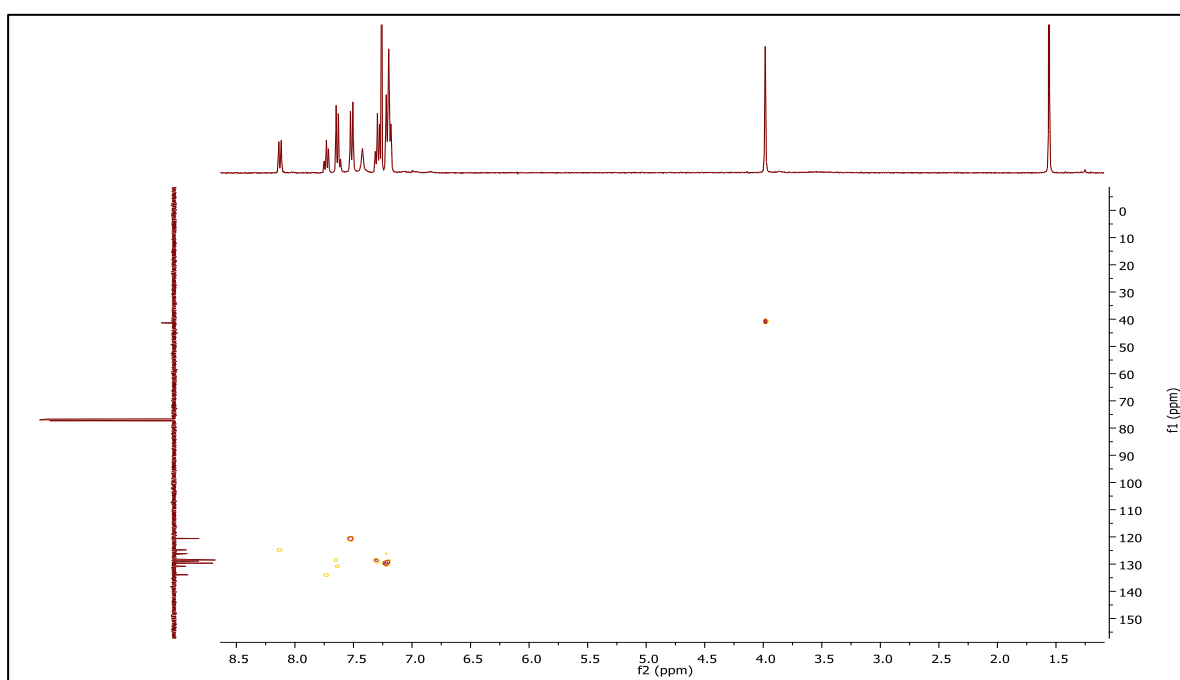
Anexo 1- Espectro de RMN ^1H do composto 3.a, em CDCl_3 .



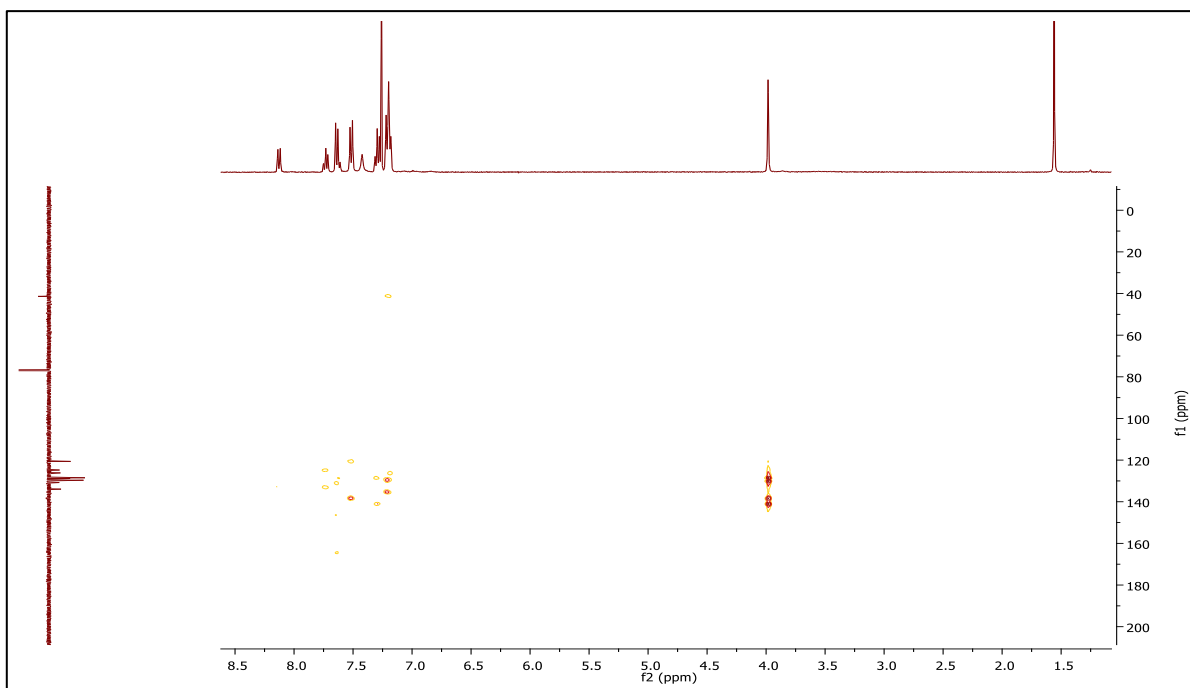
Anexo 2 - Espetro de RMN ¹³C-APT do composto 3.a, em CDCl₃.



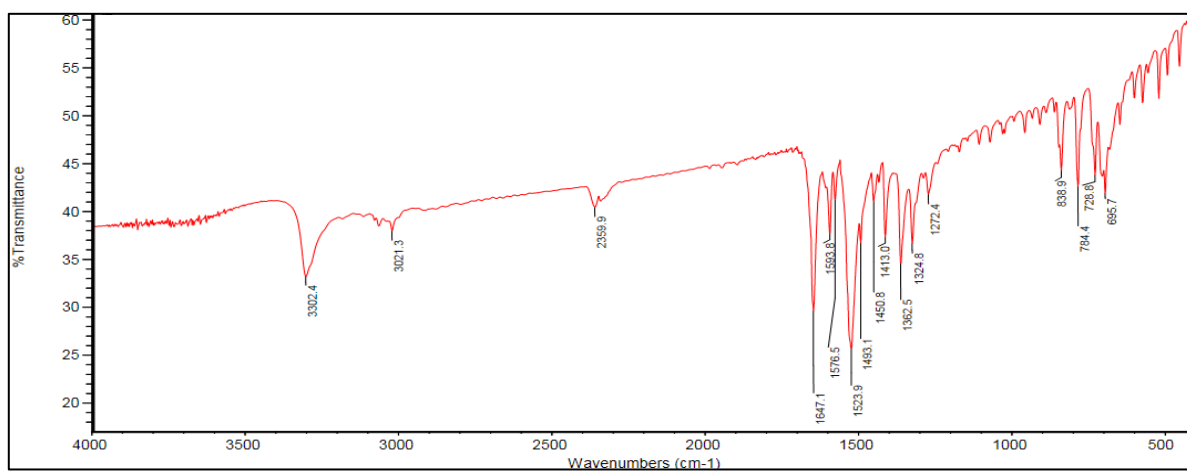
Anexo 3- Espetro COSY do composto 3.a, em CDCl_3 .



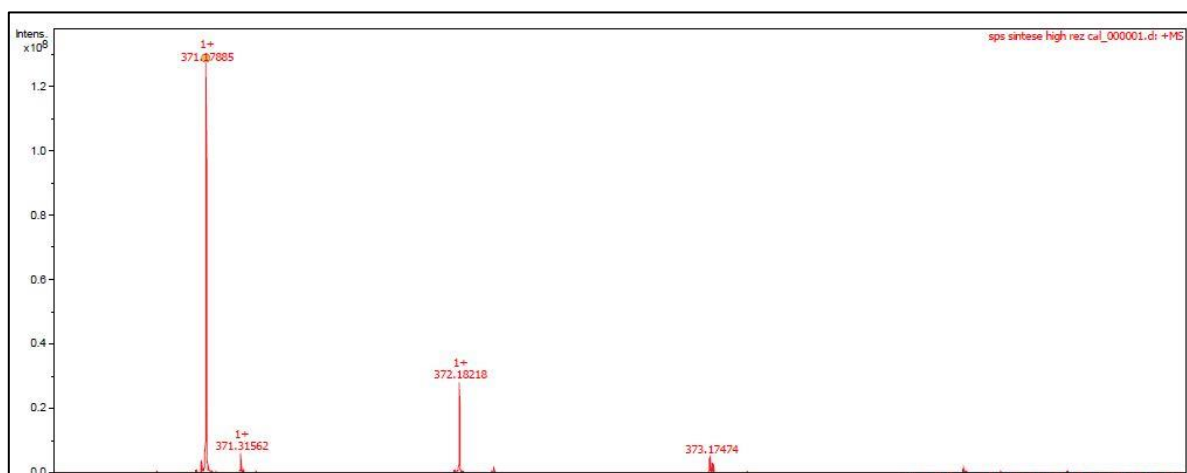
Anexo 4- Espetro HSQC do composto 3.a, em CDCl_3 .



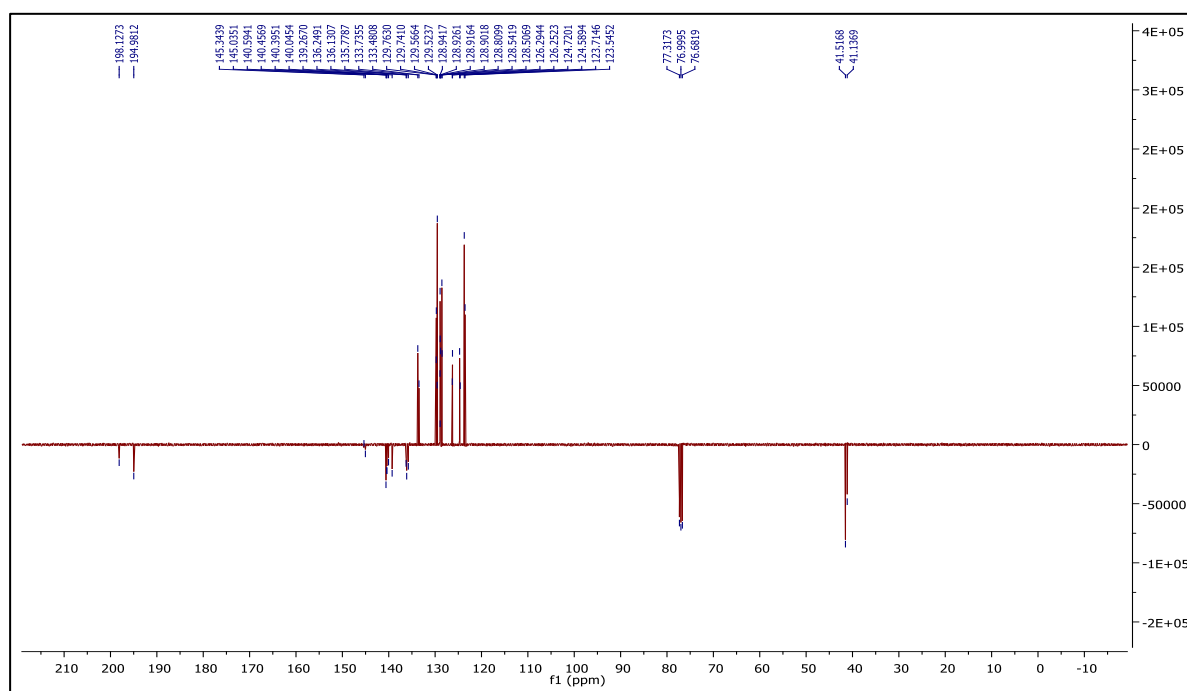
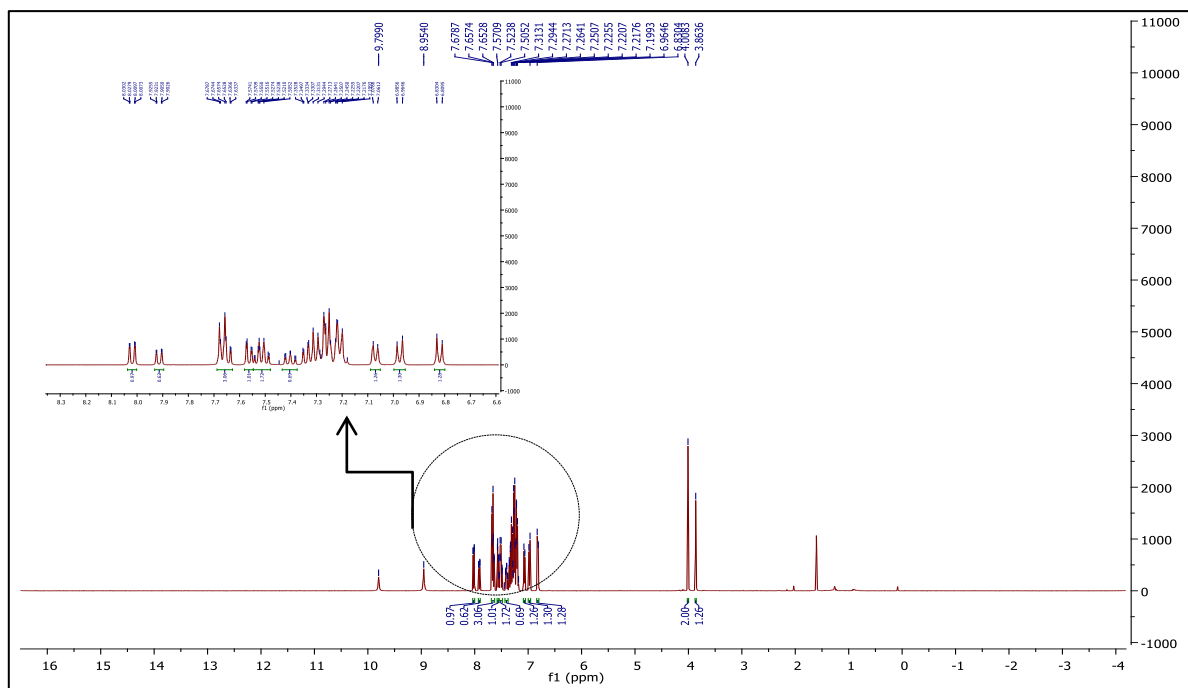
Anexo 5- Espetro HMBC do composto 3.a, em CDCl_3 .

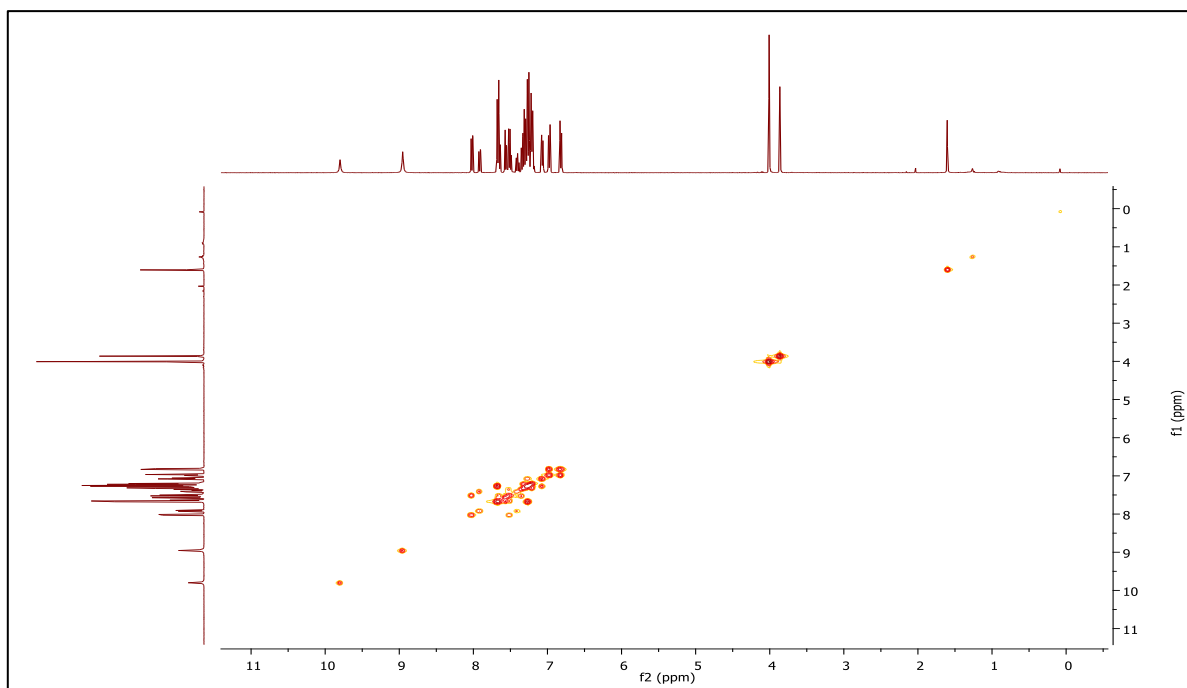


Anexo 6- Espetro de IV do composto 3.a.

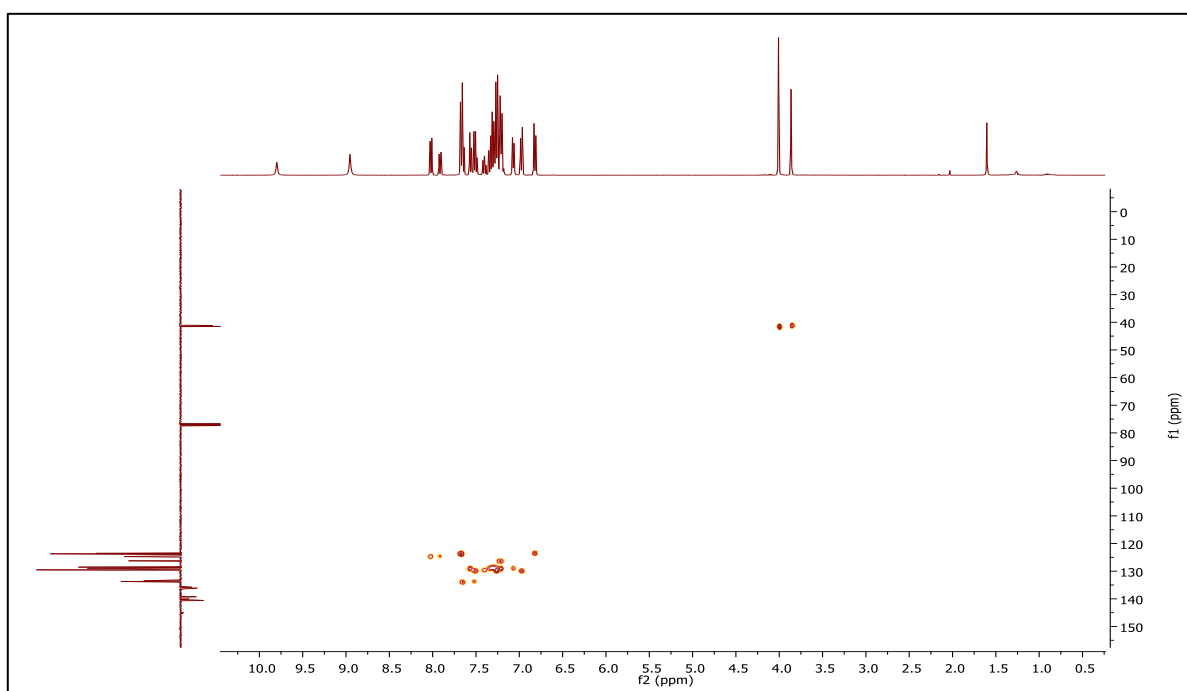


Anexo 7- Espetro de HRMS do composto 4.a.

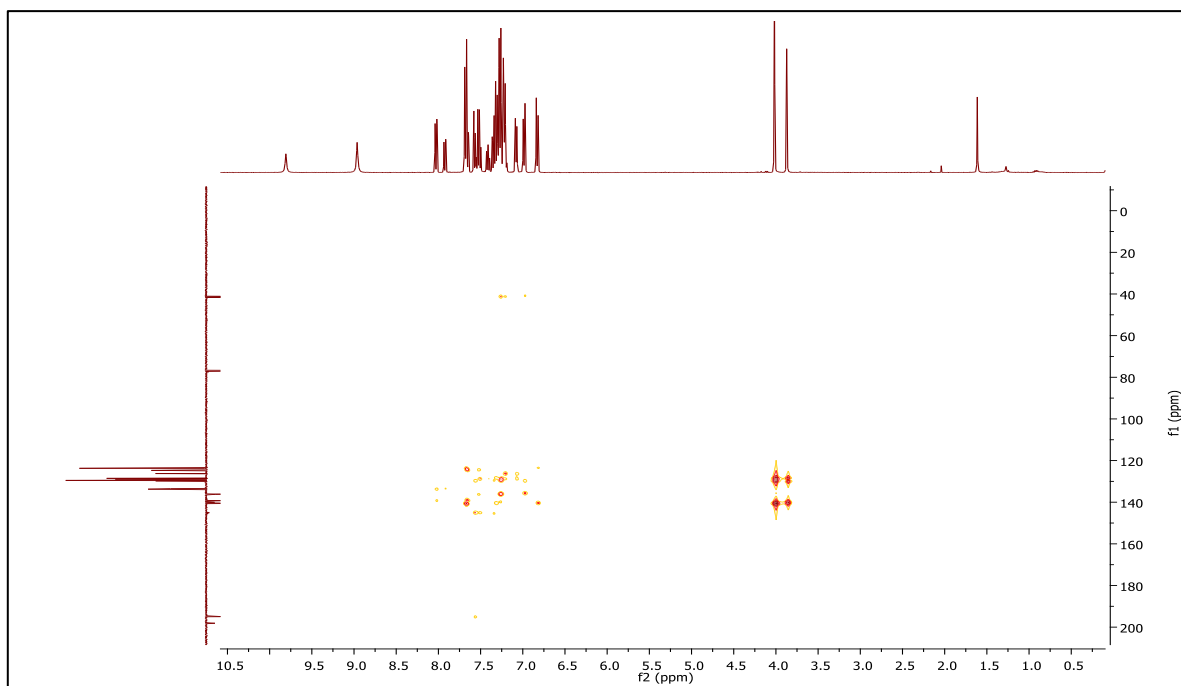




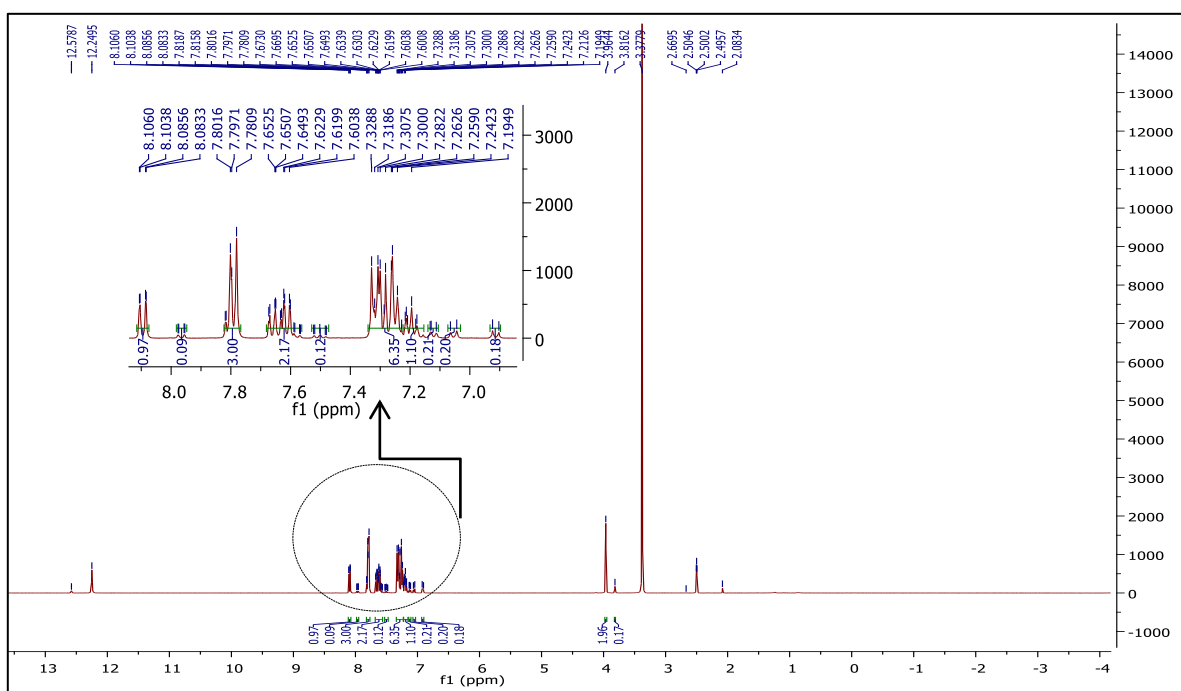
Anexo 10- Espetro COSY do composto 4.a, em CDCl_3 .



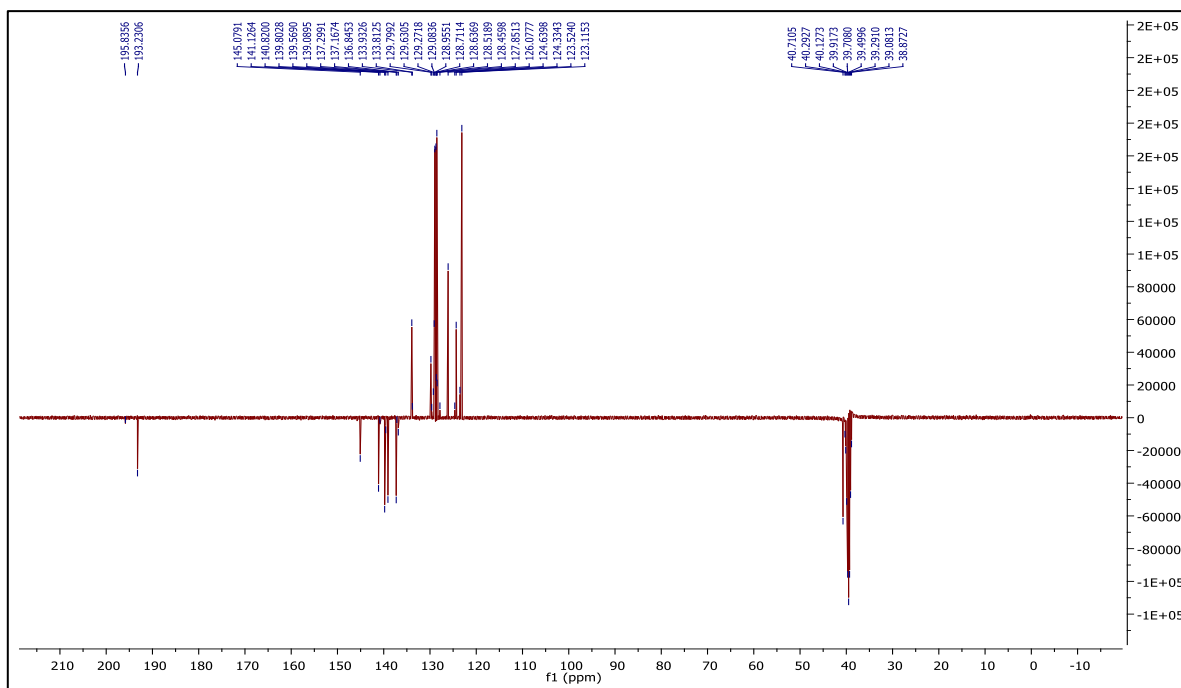
Anexo 11- Espetro HSQC do composto 4.a, em CDCl_3 .



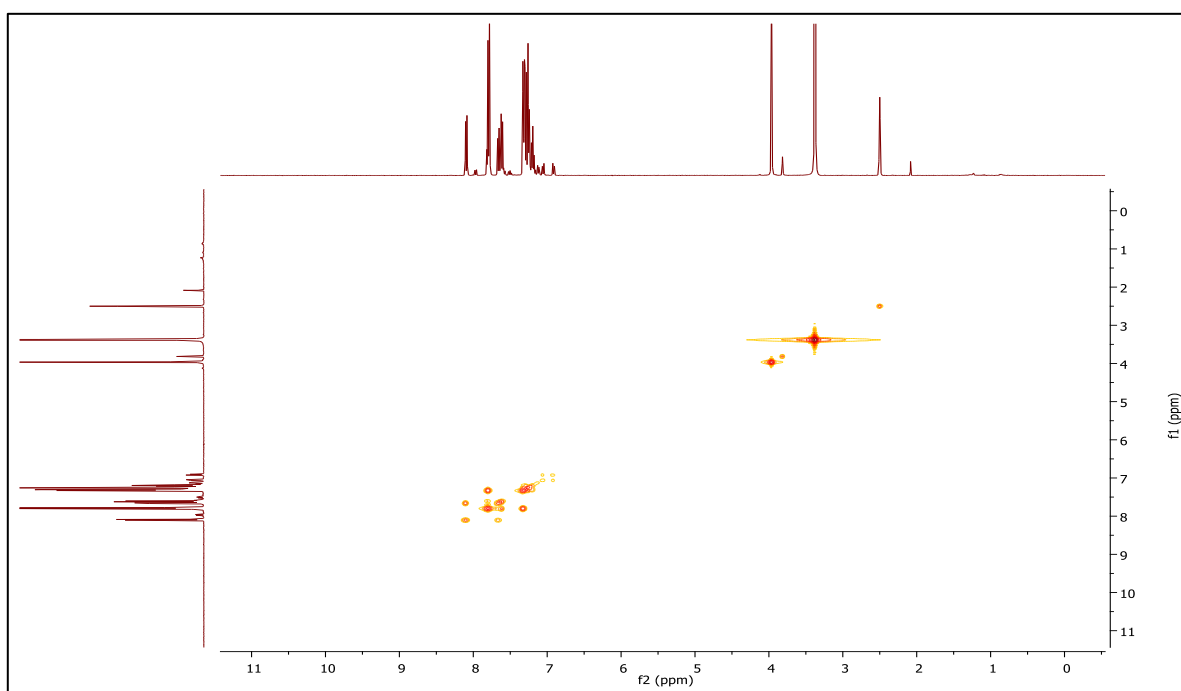
Anexo 12- Espectro HMBC do composto 4.a, em CDCl_3 .



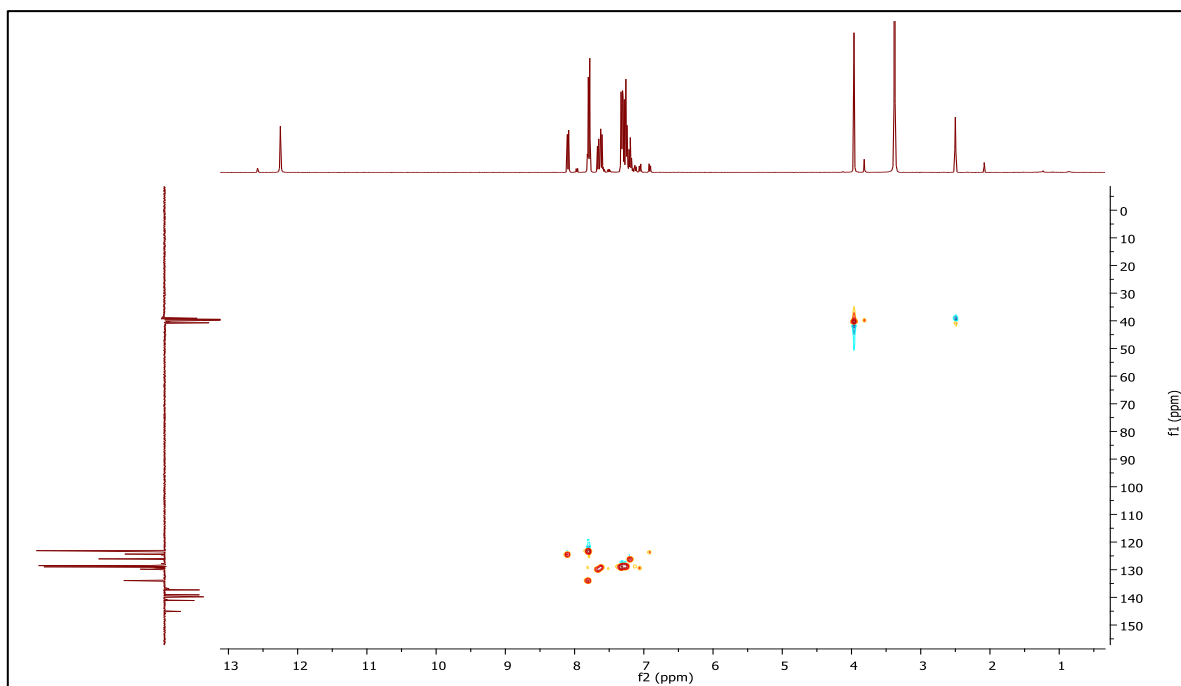
Anexo 13- Espectro de RMN ^1H do composto 4.a, em $\text{DMSO}-d_6$.



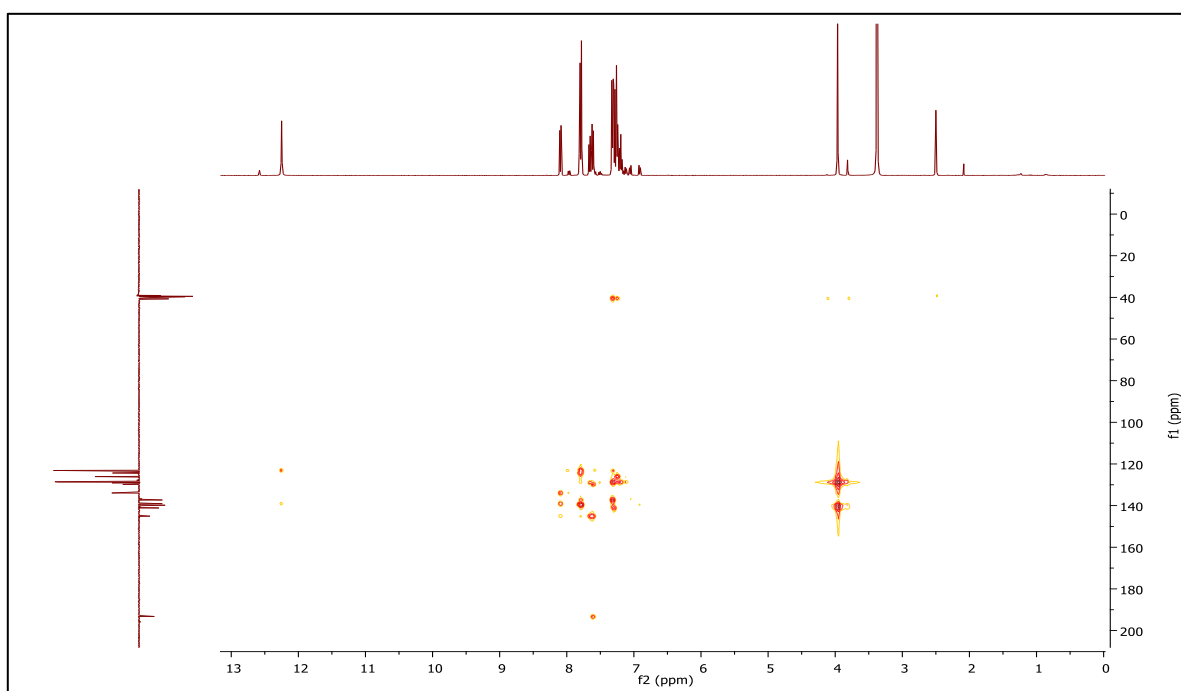
Anexo 14- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.a, em $\text{DMSO-}d_6$.



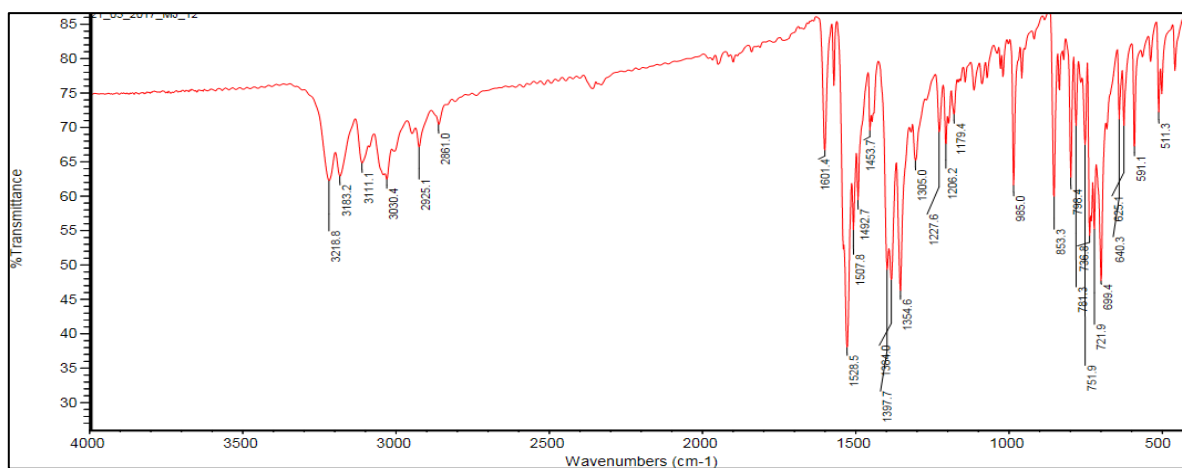
Anexo 15- Espetro COSY do composto 4.a, em $\text{DMSO-}d_6$.



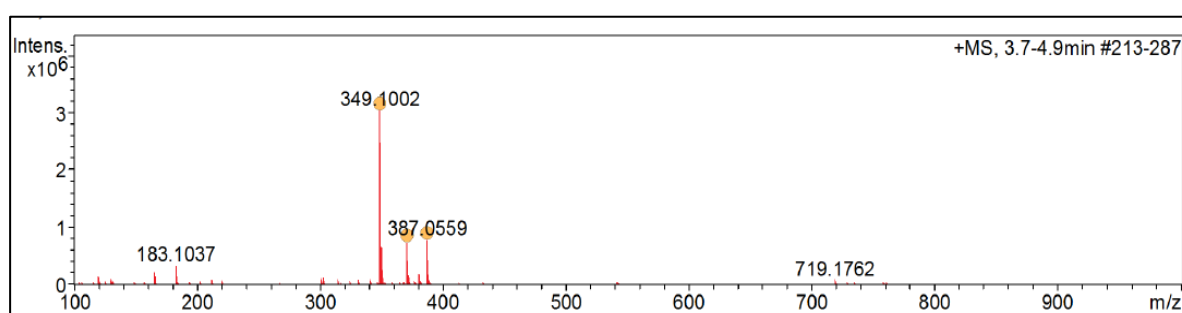
Anexo 16- Espetro HSQC do composto 4.a, em DMSO- d_6 .



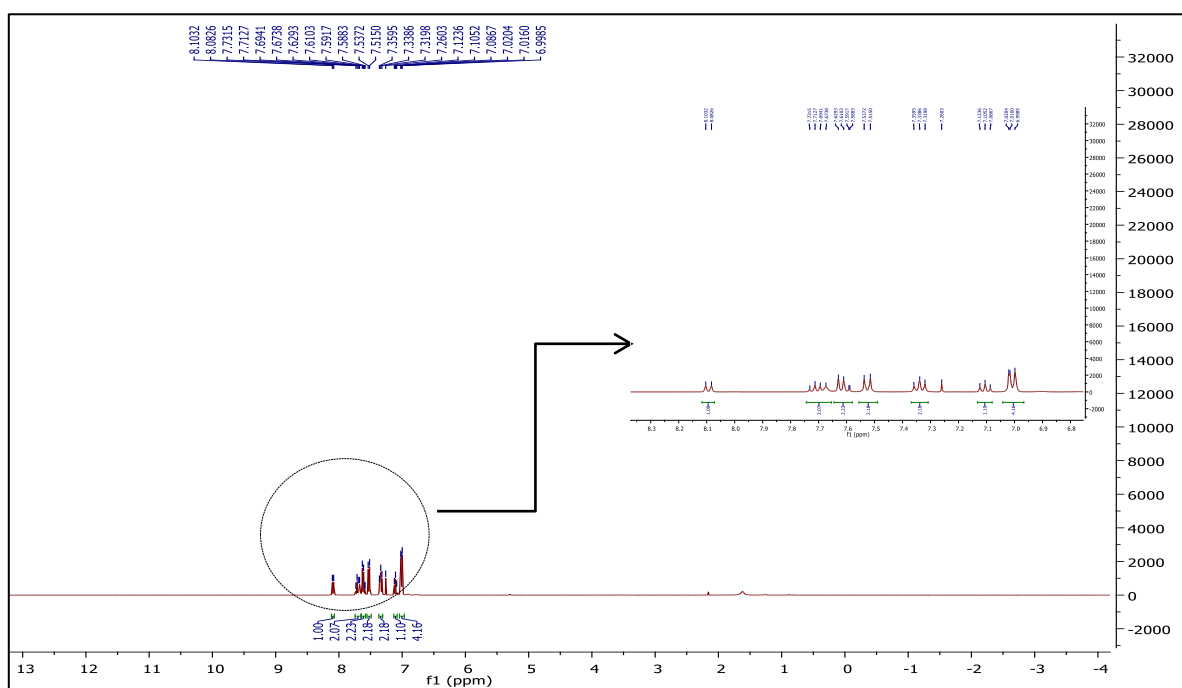
Anexo 17- Espetro HMBC do composto 4.a, em DMSO- d_6 .



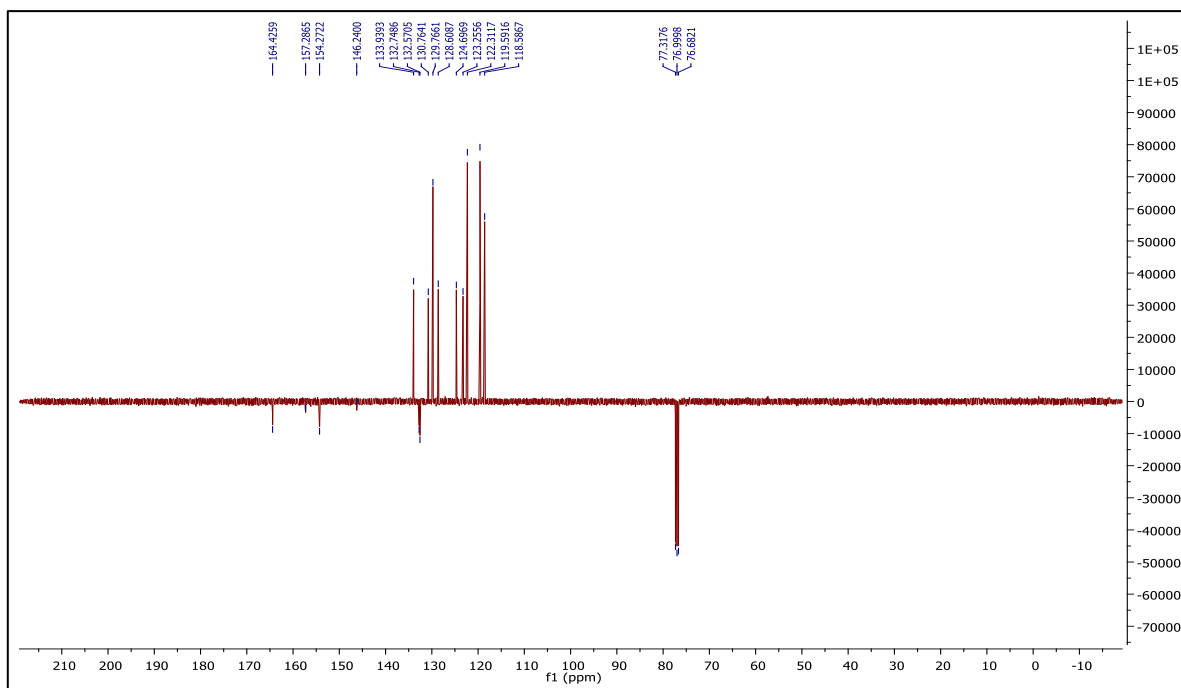
Anexo 18- Espectro de IV do composto 4.a.



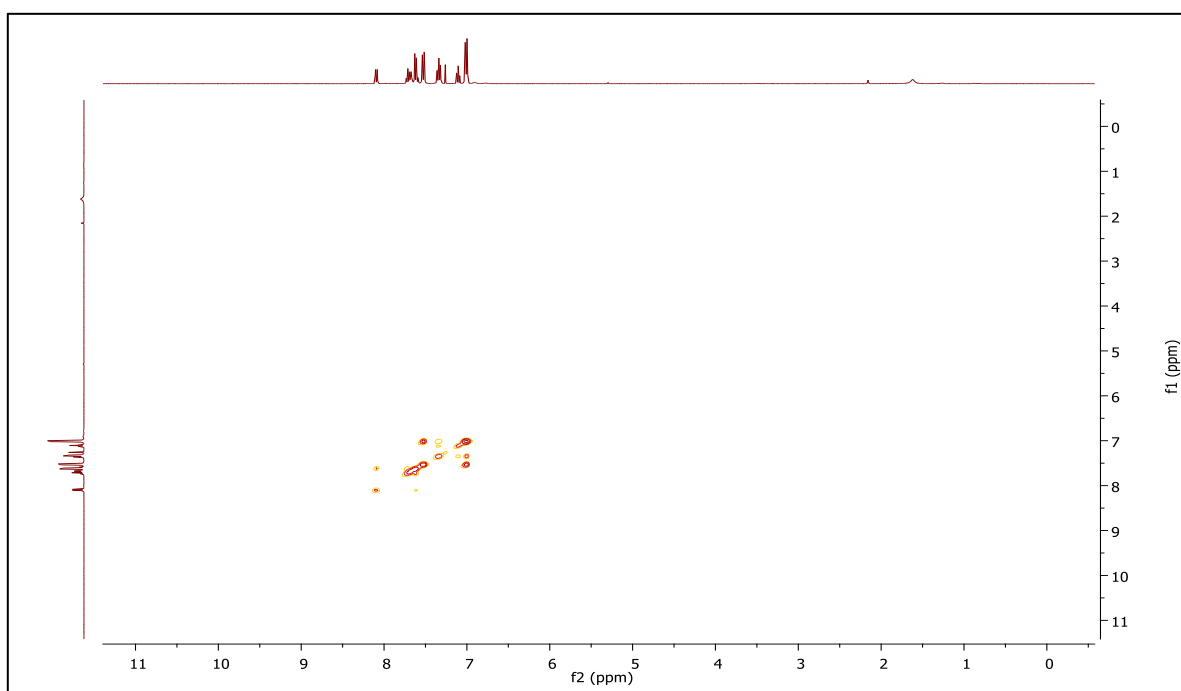
Anexo 19- Espectro de HRMS do composto 4.a.



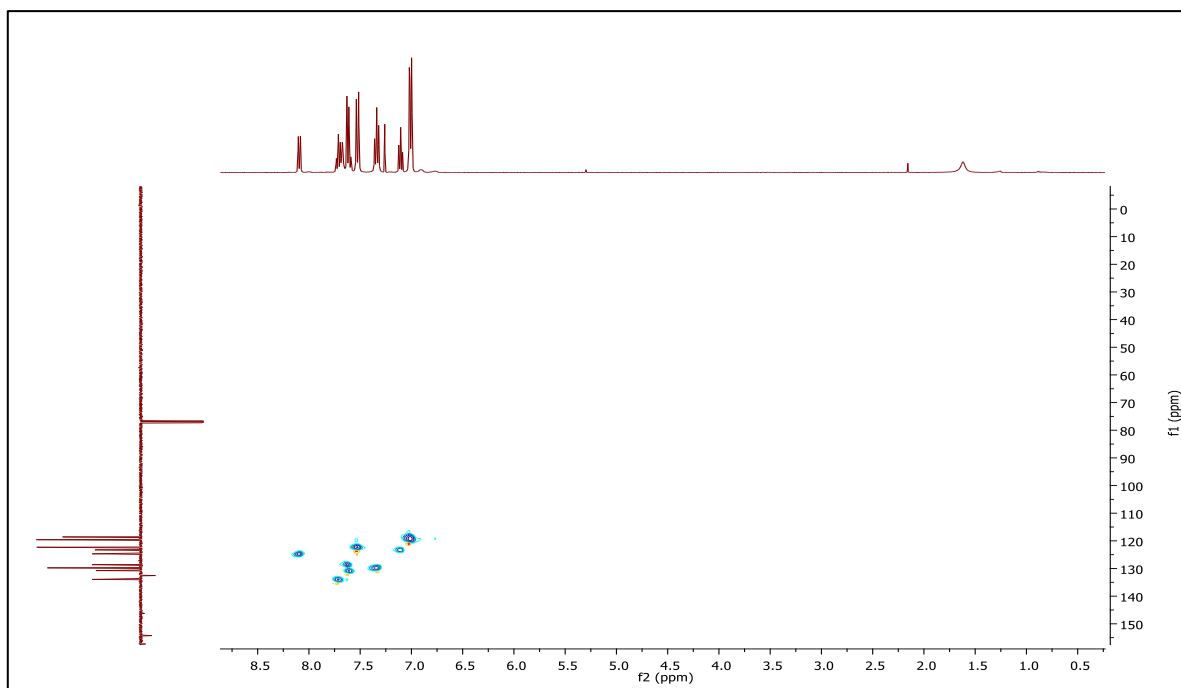
Anexo 20- Espectro de RMN ¹H do composto 3.b, em CDCl₃.



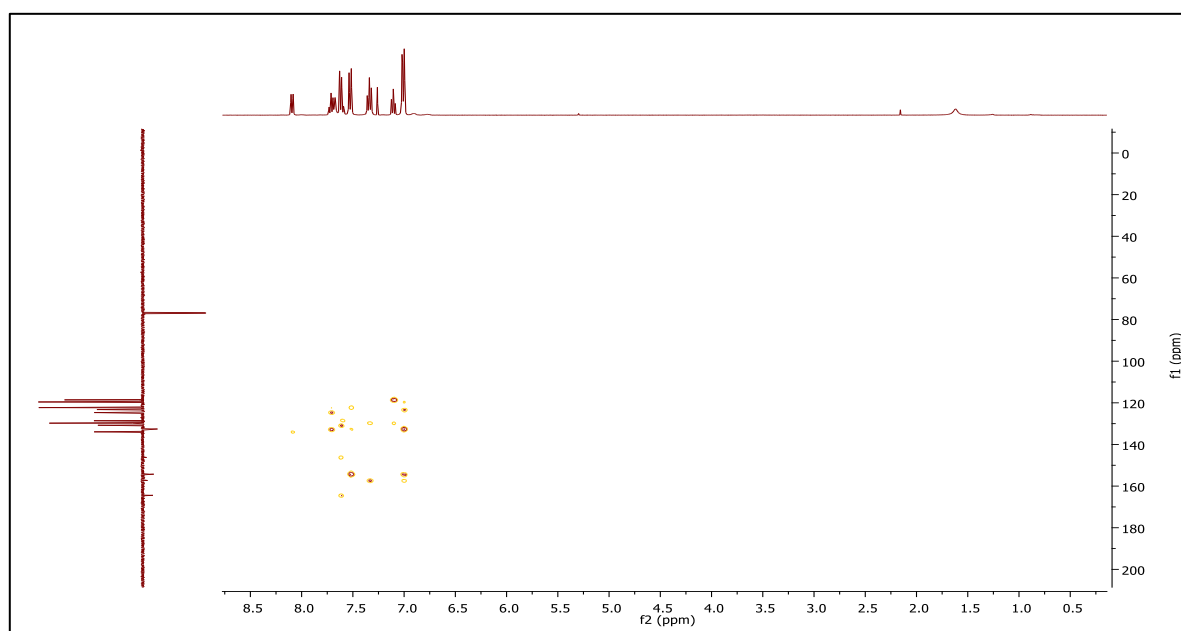
Anexo 21- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.b, em CDCl_3 .



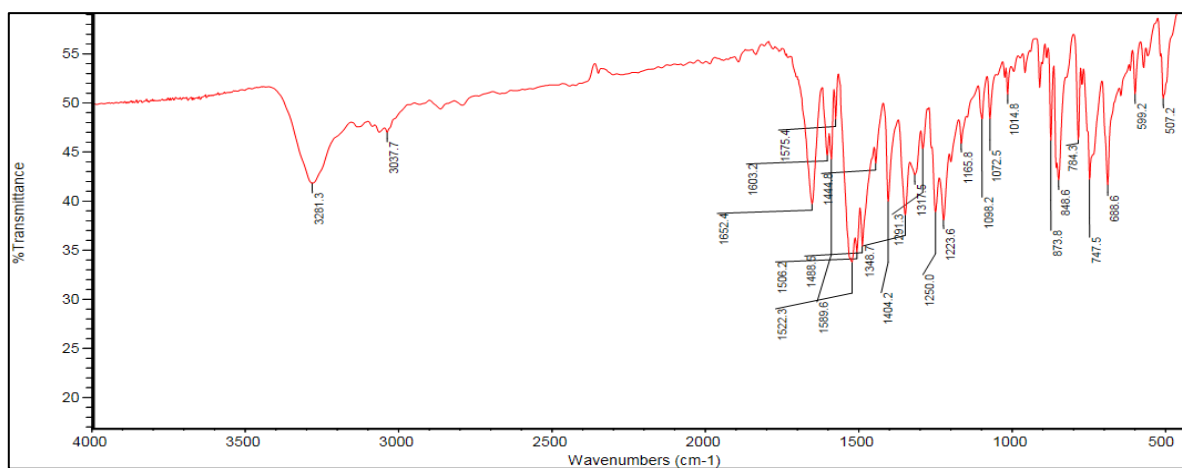
Anexo 22- Espectro COSY do composto 3.b, em CDCl_3 .



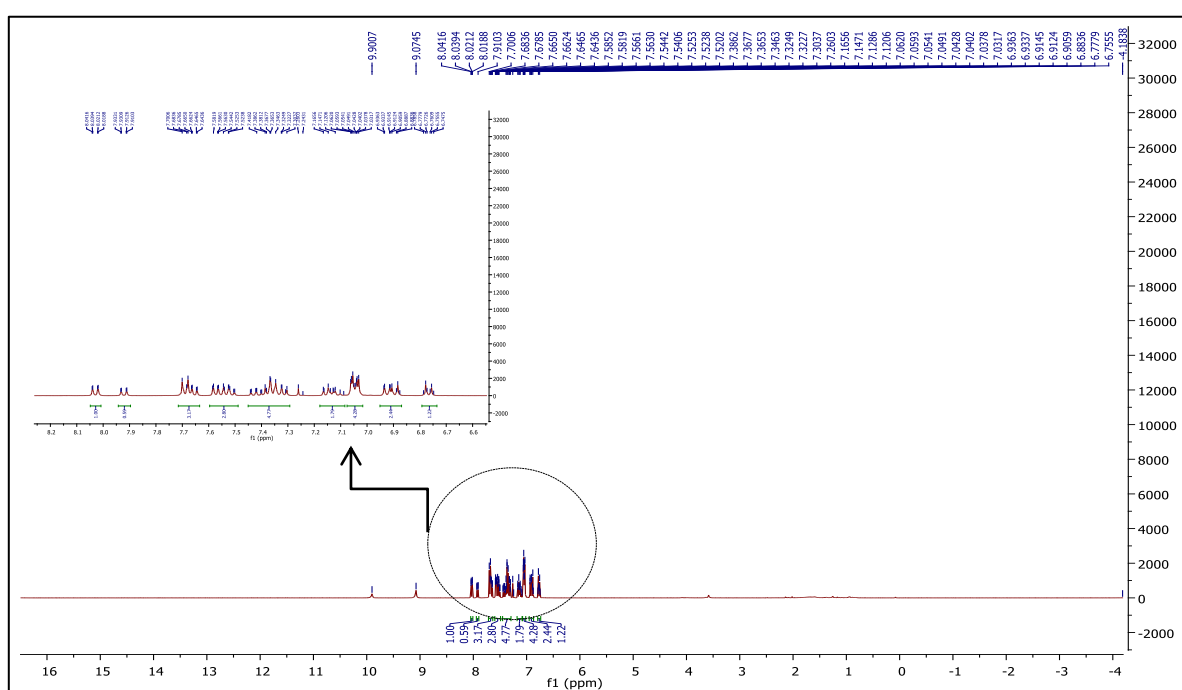
Anexo 23- Espetro HSQC do composto 3.b, em CDCl₃.



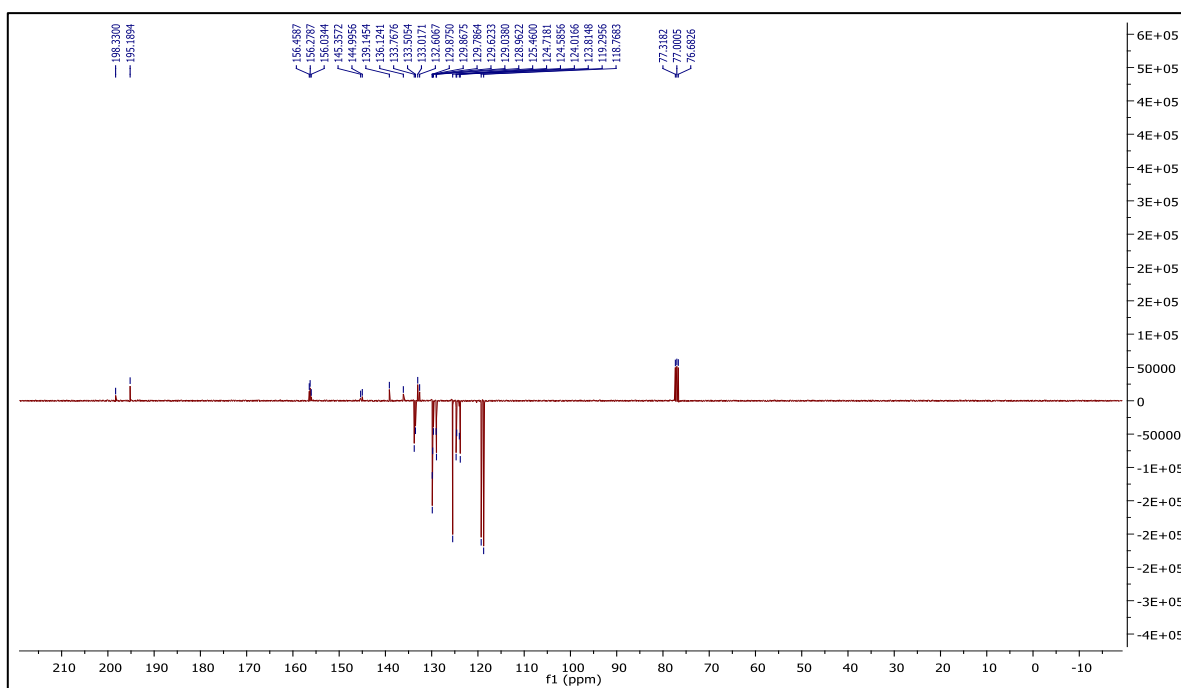
Anexo 24- Espetro HMBC do composto 3.b, em CDCl₃.



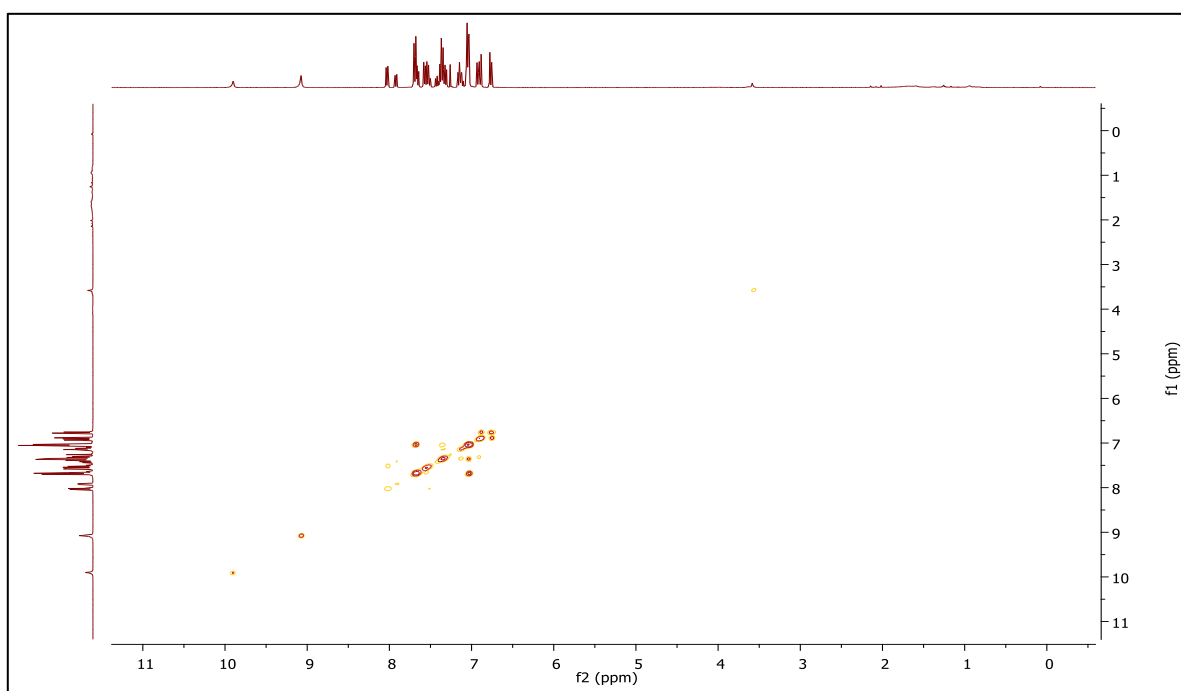
Anexo 25- Espectro de IV do composto 3.b.



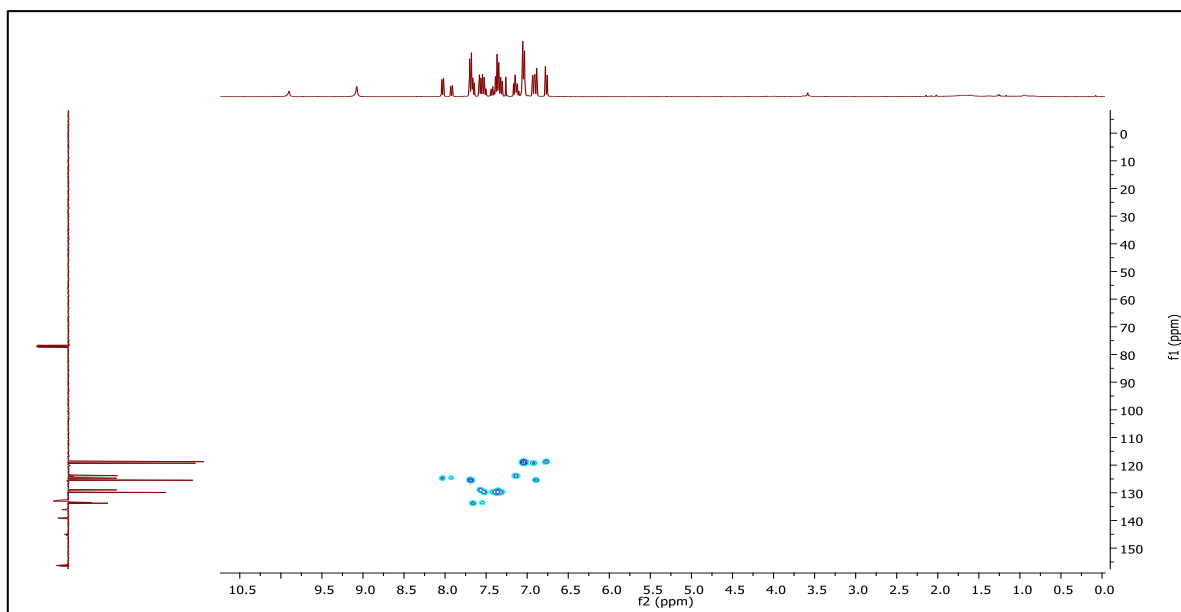
Anexo 26- Espectro de RMN ¹H do composto 4.b, em CDCl₃.



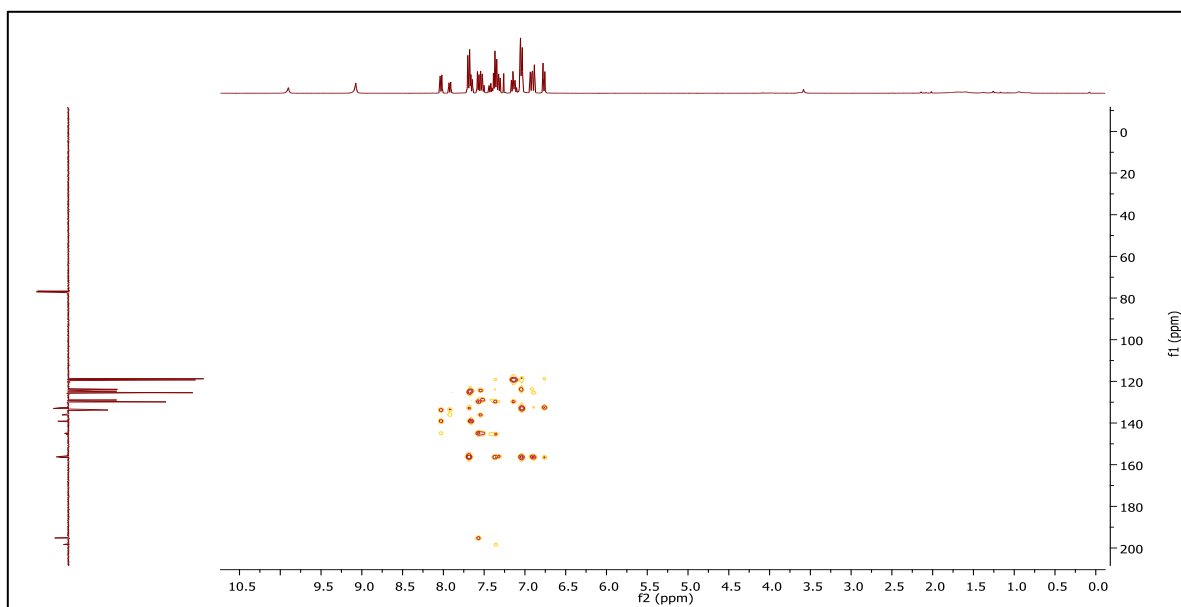
Anexo 27- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.b, em CDCl_3 .



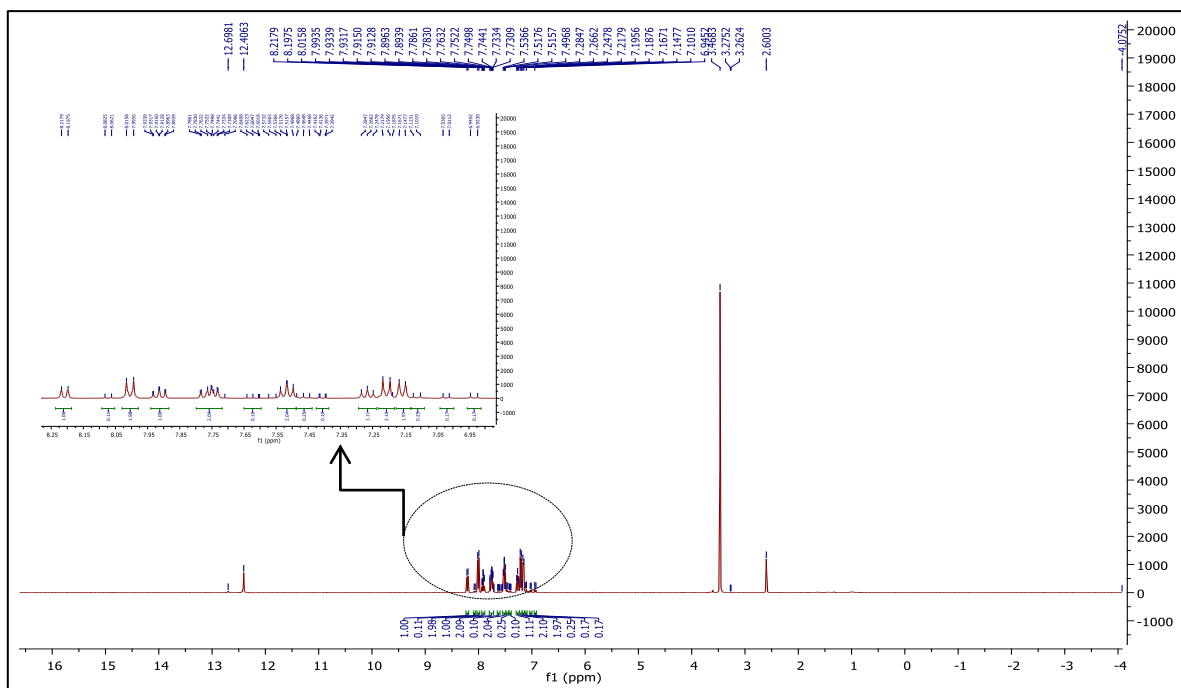
Anexo 28- Espectro COSY do composto 4.b, em CDCl_3 .



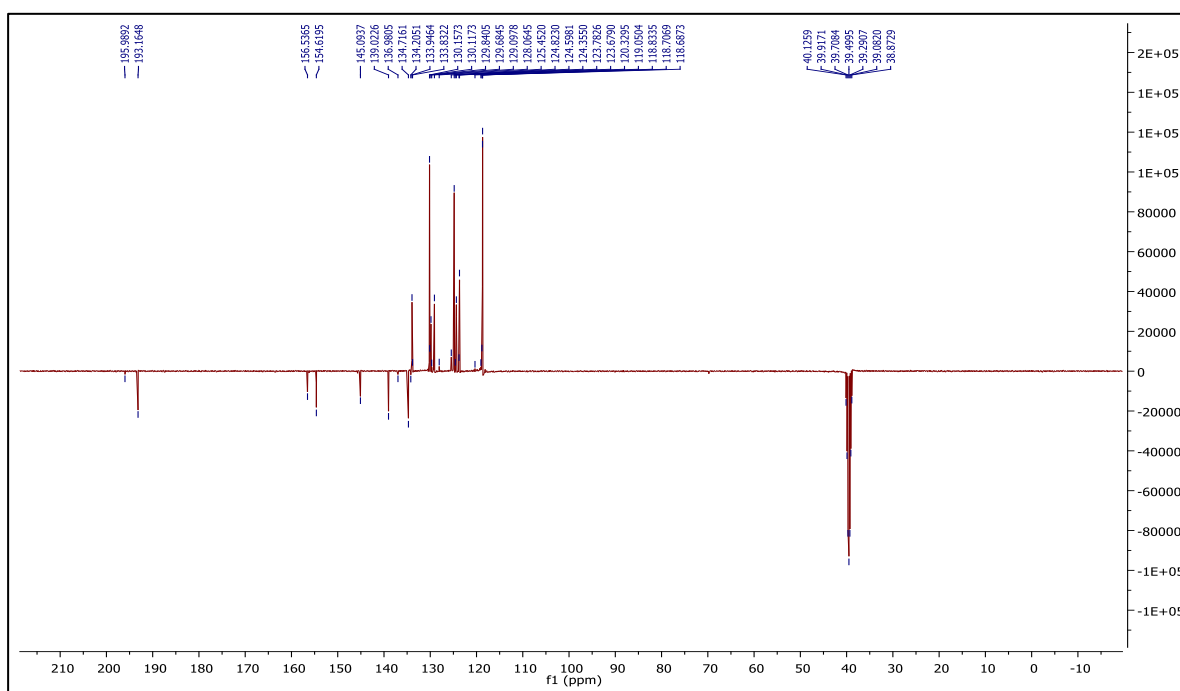
Anexo 29- Espectro HSQC do composto 4.b, em CDCl_3 .



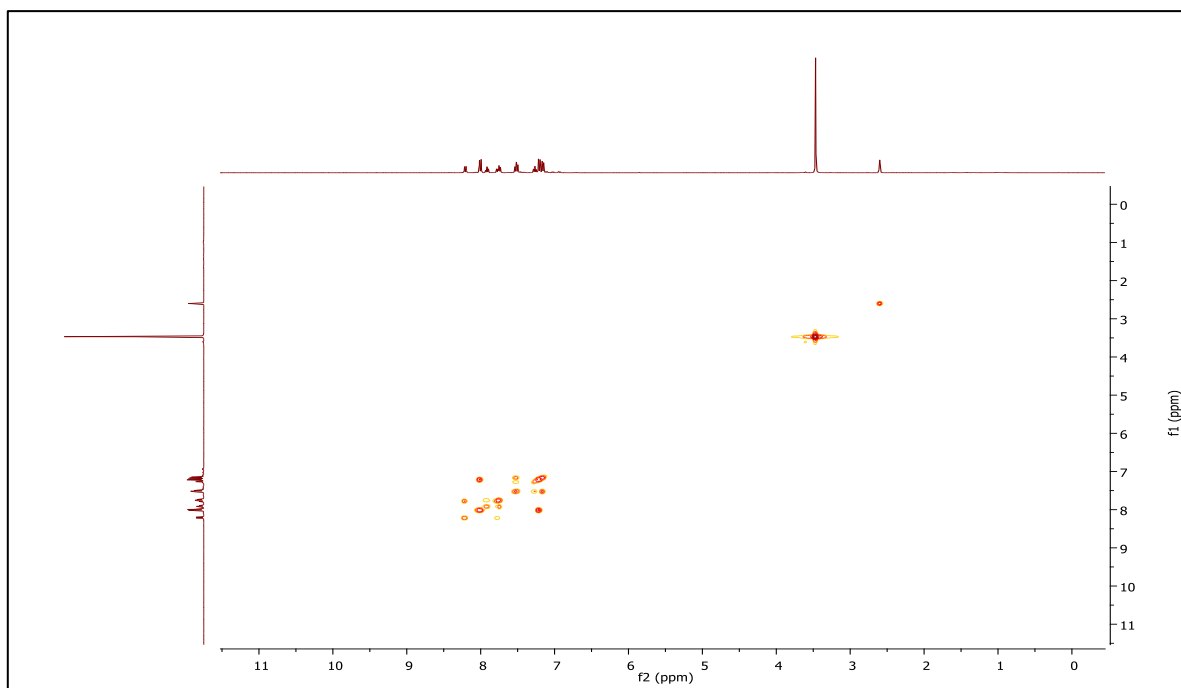
Anexo 30- Espectro HMBC do composto 4.b, em CDCl_3 .



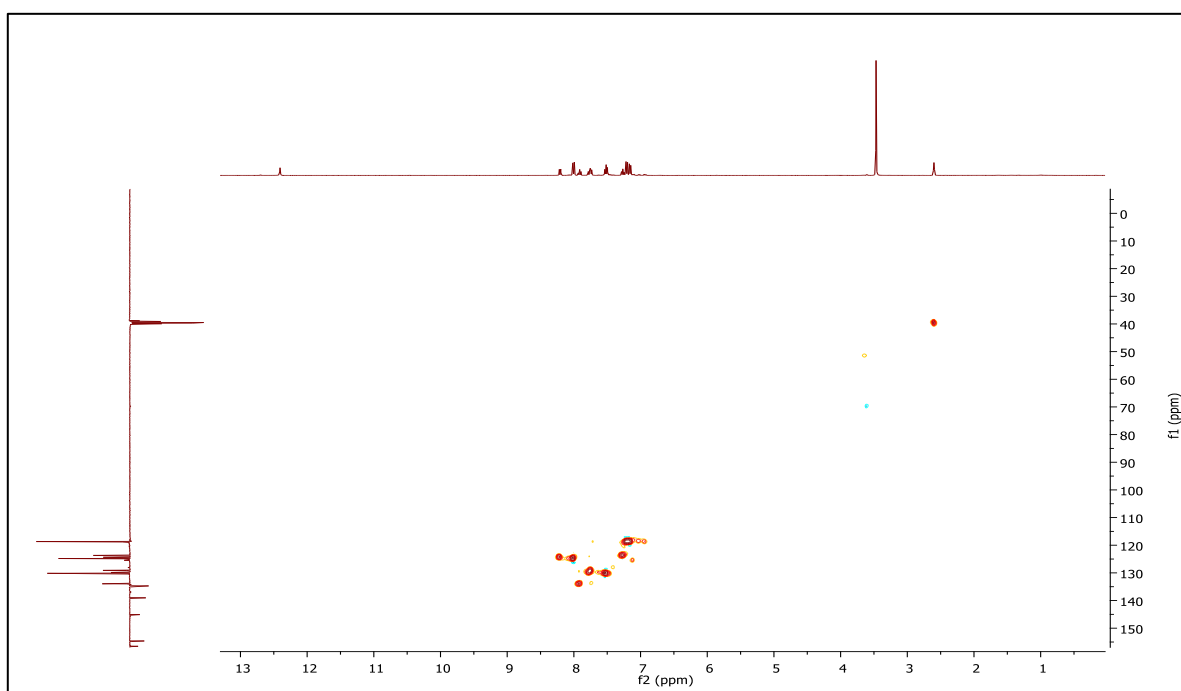
Anexo 31- Espetro de RMN ^1H do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.



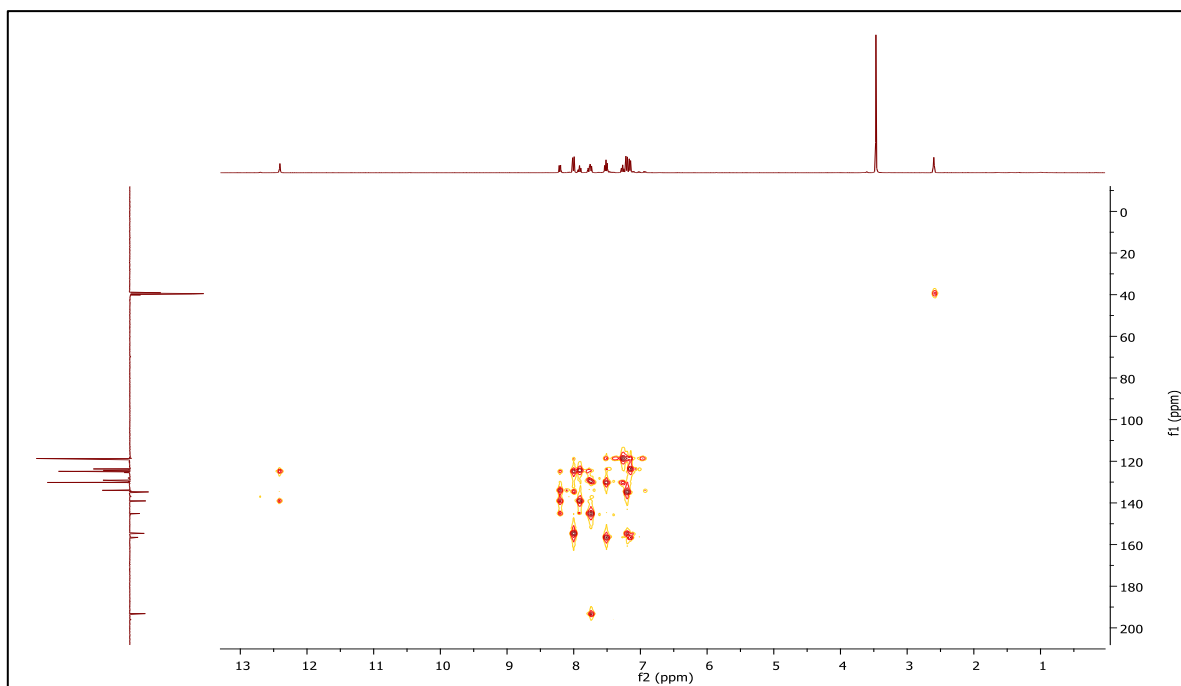
Anexo 32- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.b, em $\text{DMSO}-d_6$.



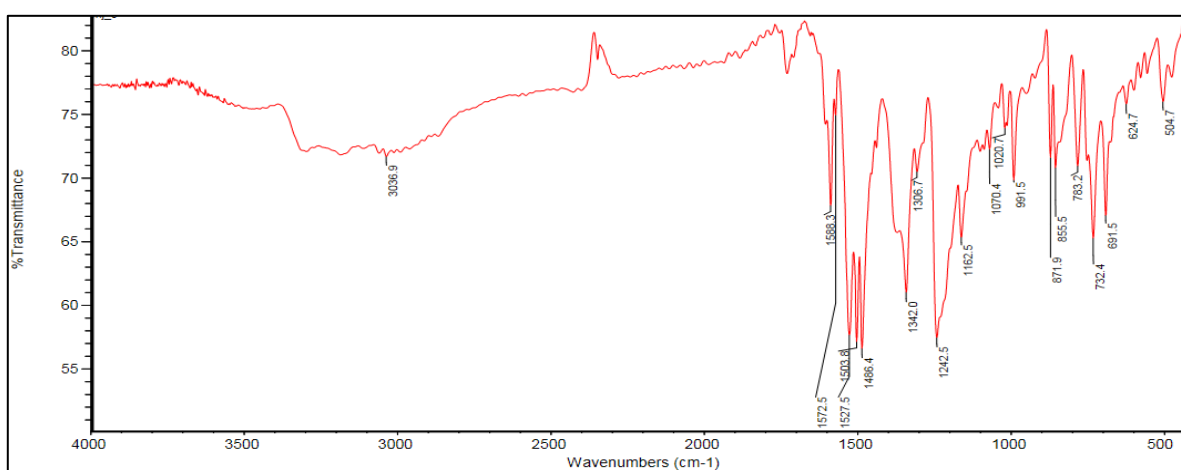
Anexo 33- Espetro COSY do composto 4.b, em DMSO- d_6 .



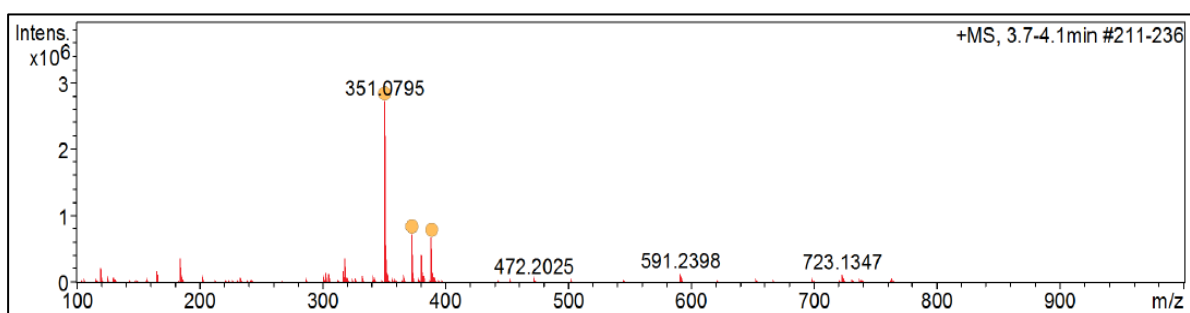
Anexo 34- Espetro HSQC do composto 4.b, em DMSO- d_6 .



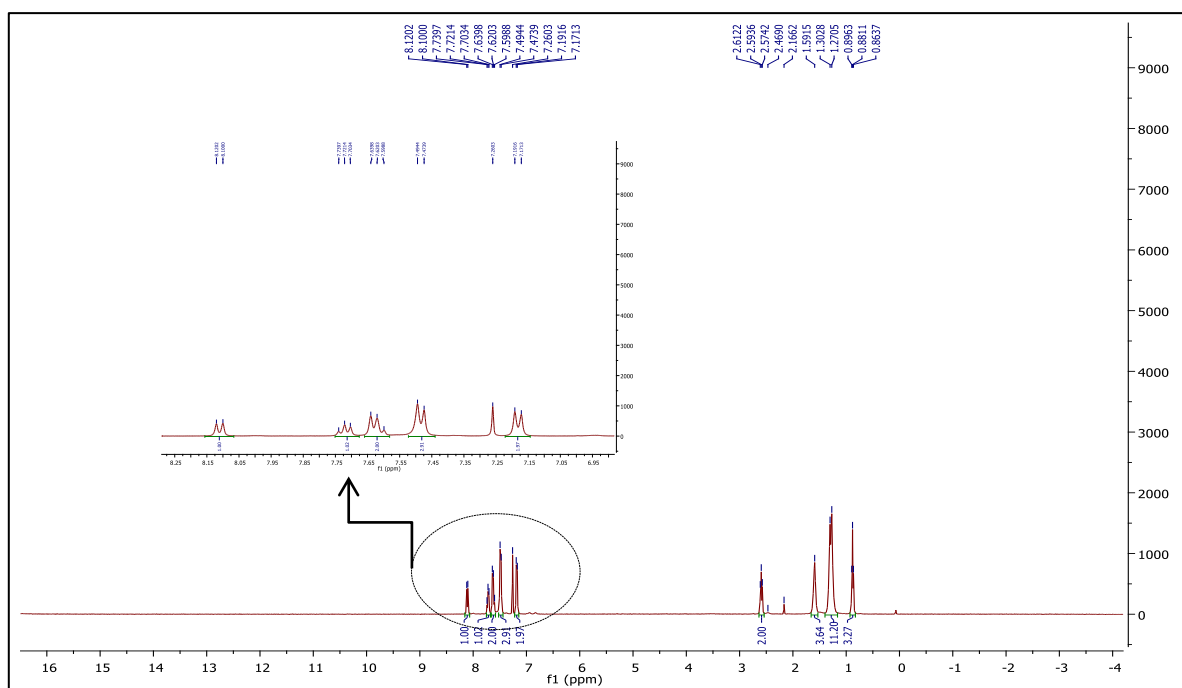
Anexo 35- Espetro HMBC do composto 4.b, em DMSO- d_6 .



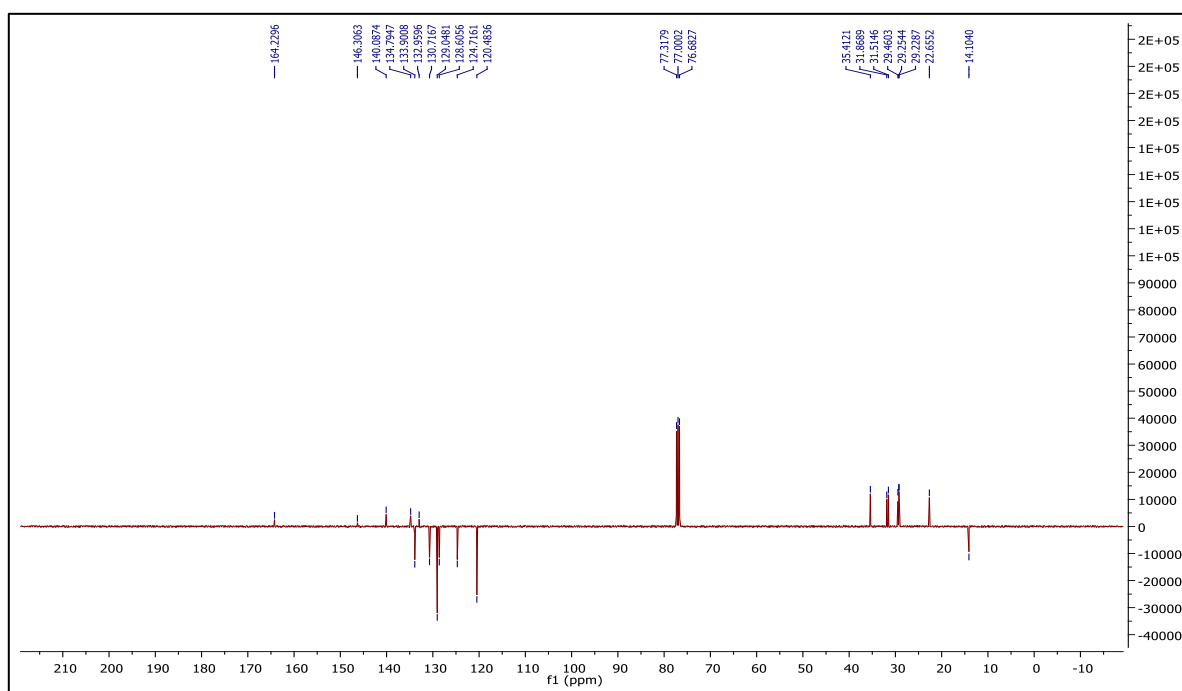
Anexo 36- Espetro de IV do composto 4.b.



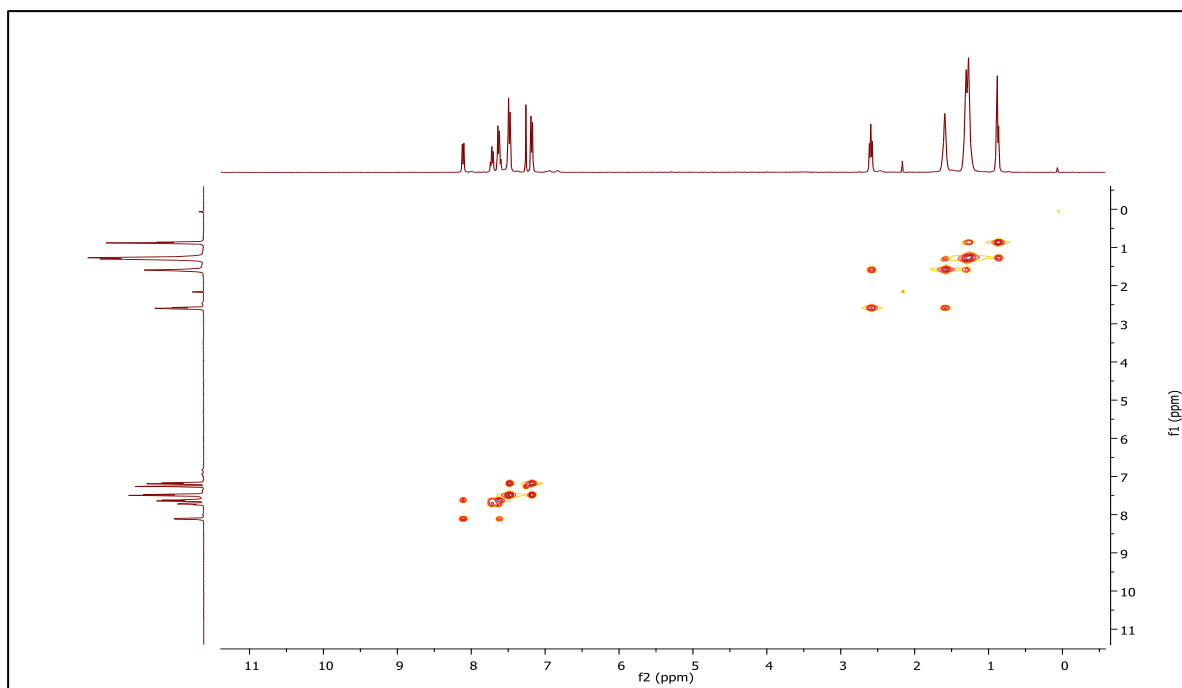
Anexo 37- Espetro de HRMS do composto 4.b.



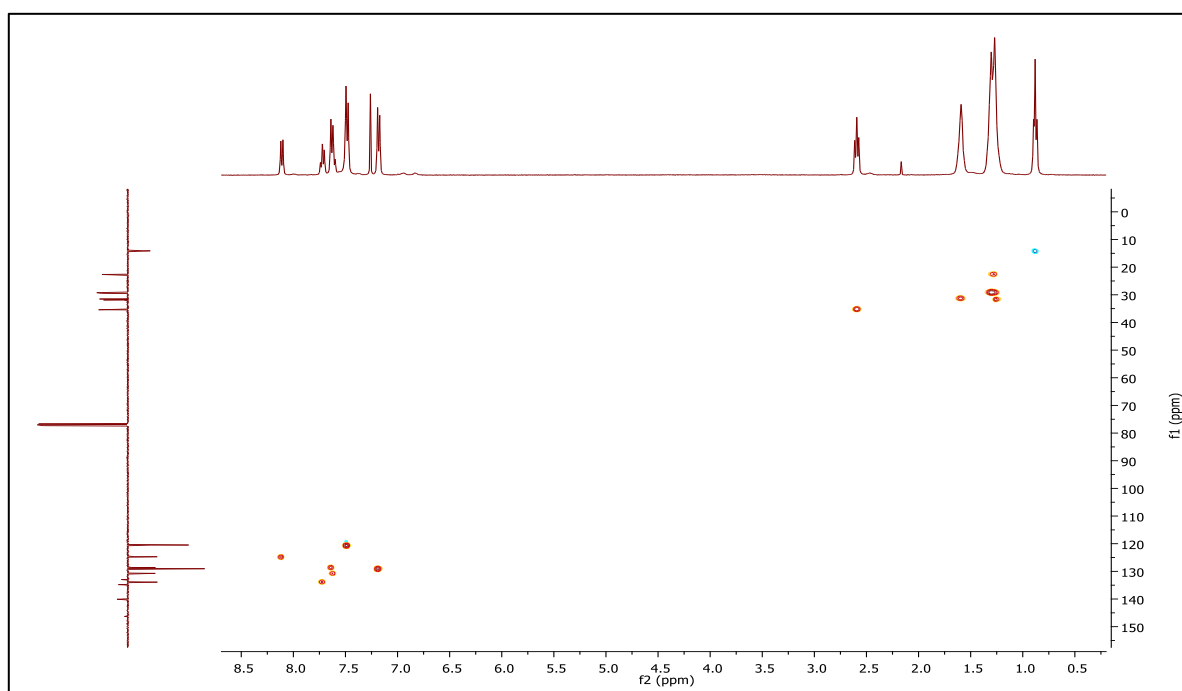
Anexo 38- Espetro de RMN ^1H do composto 3.c, em CDCl_3 .



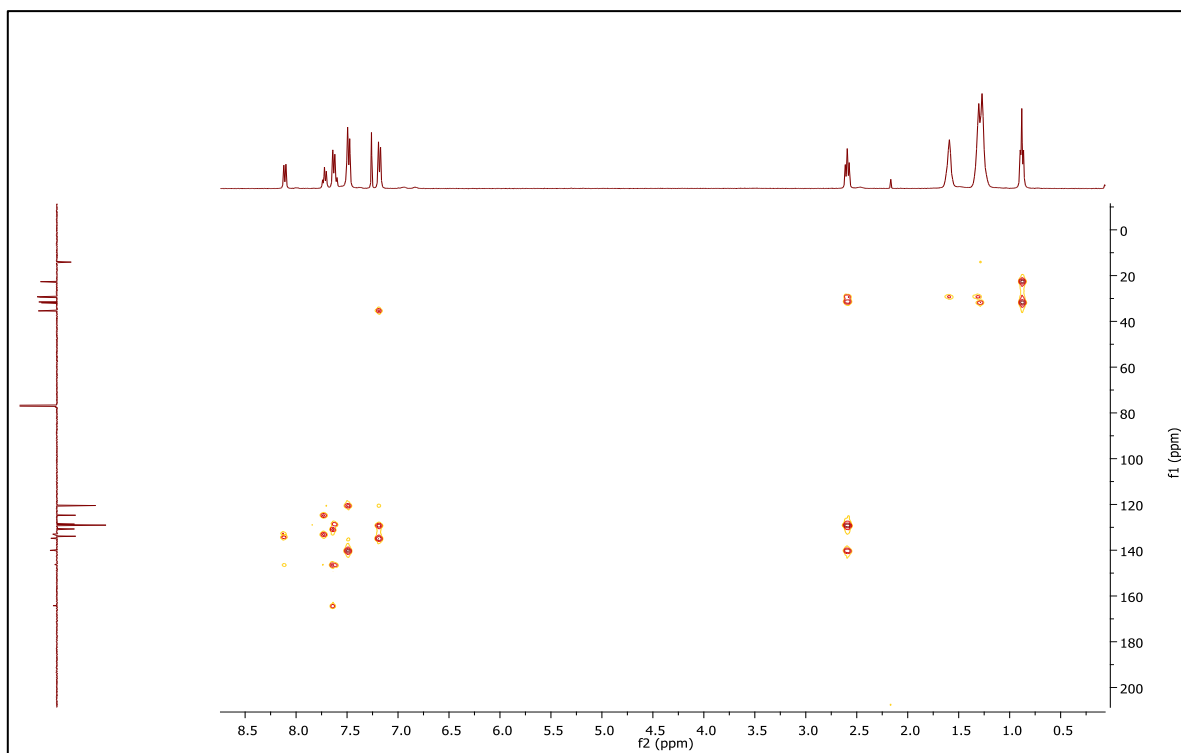
Anexo 39- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.c, em CDCl_3 .



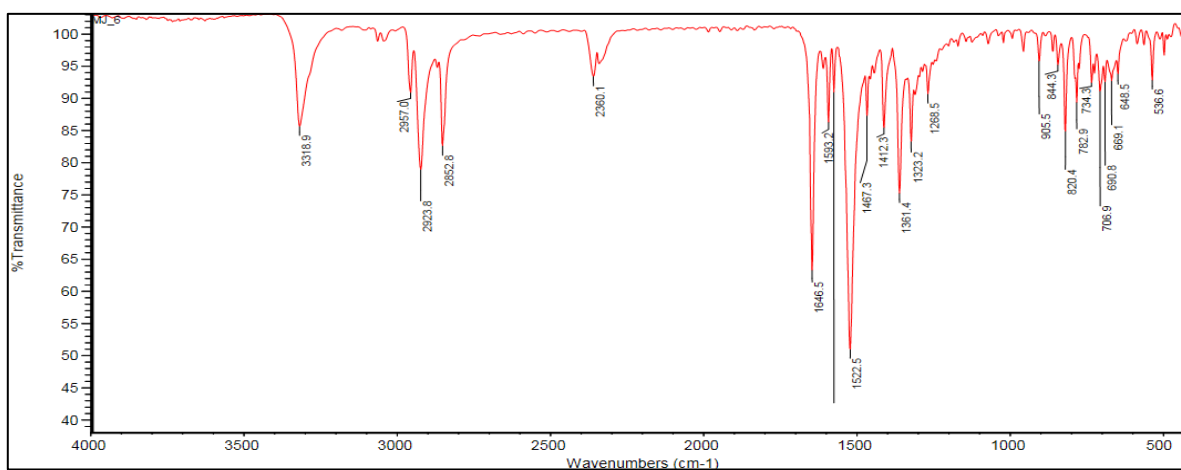
Anexo 40- Espetro COSY do composto 3.c, em CDCl_3 .



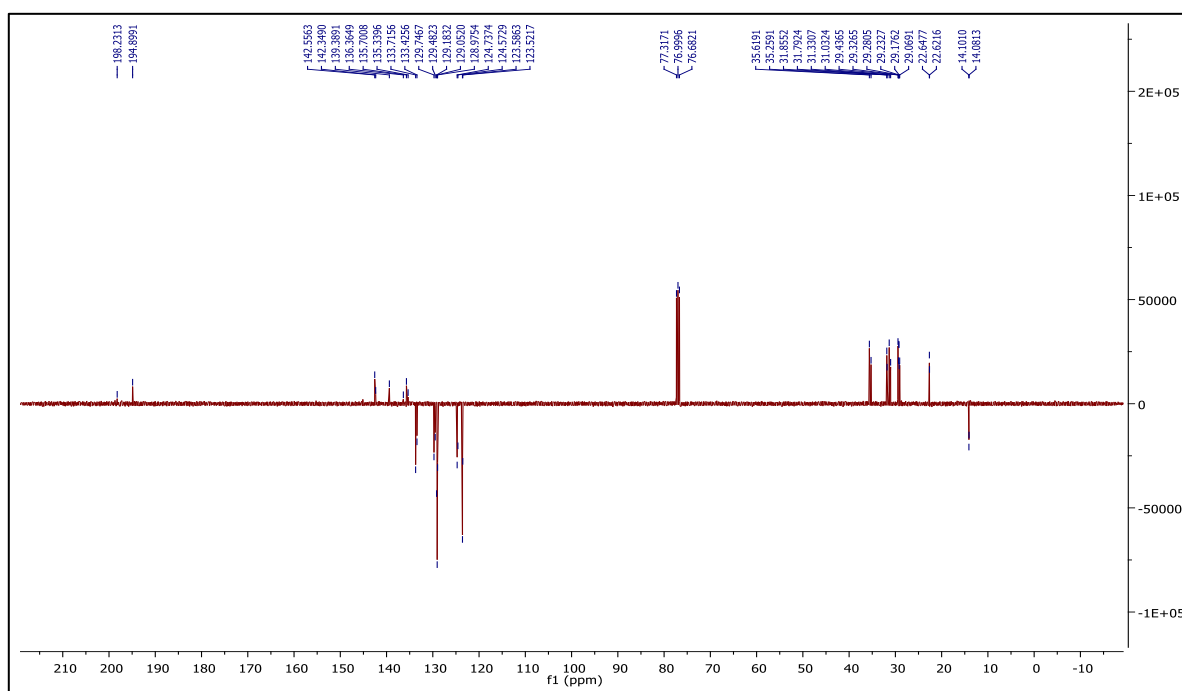
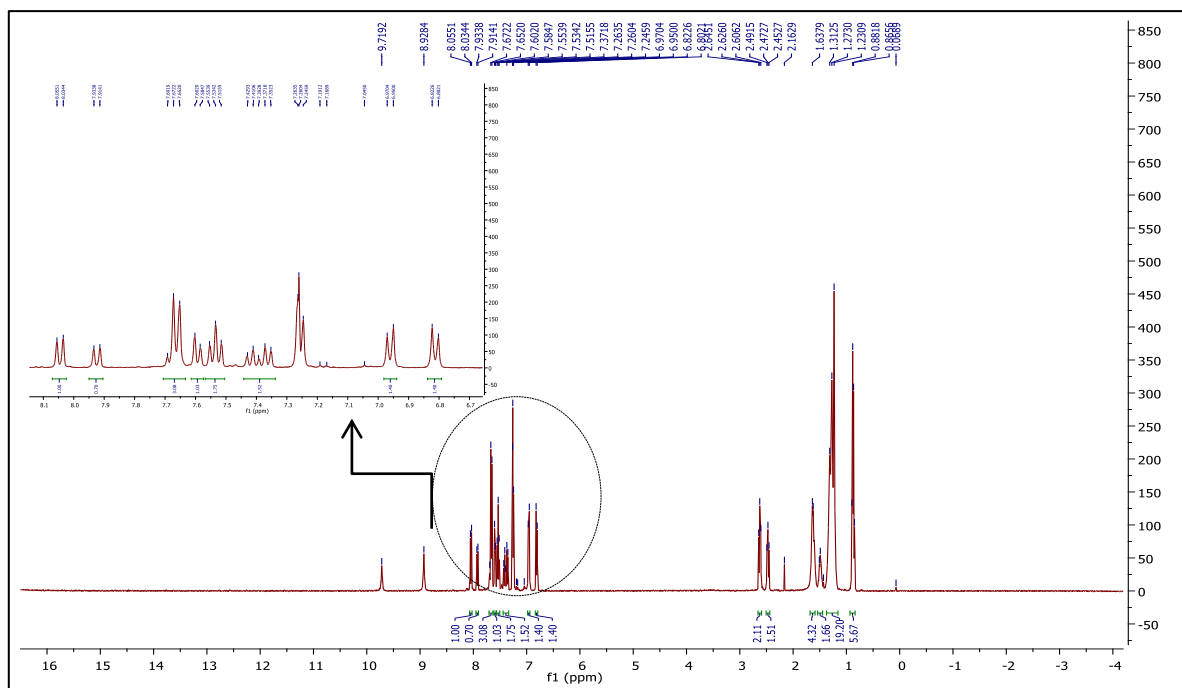
Anexo 41- Espetro HSQC do composto 3.c, em CDCl_3 .

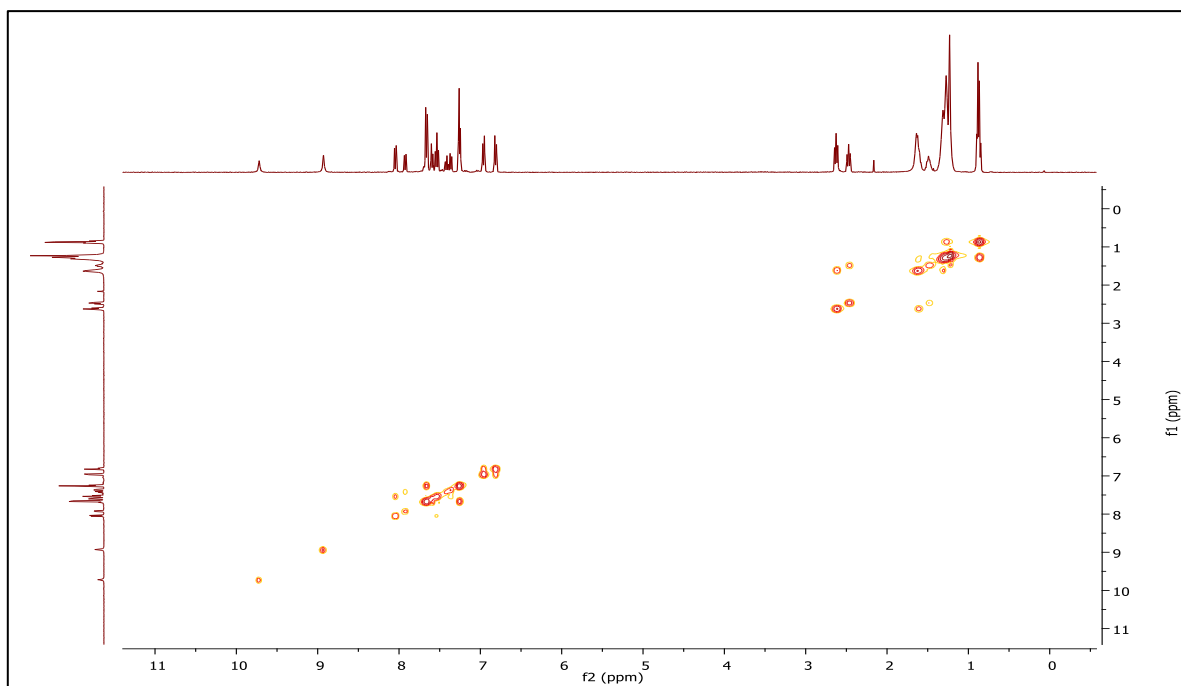


Anexo 42- Espetro HMBC do composto 3.c, em CDCl_3 .

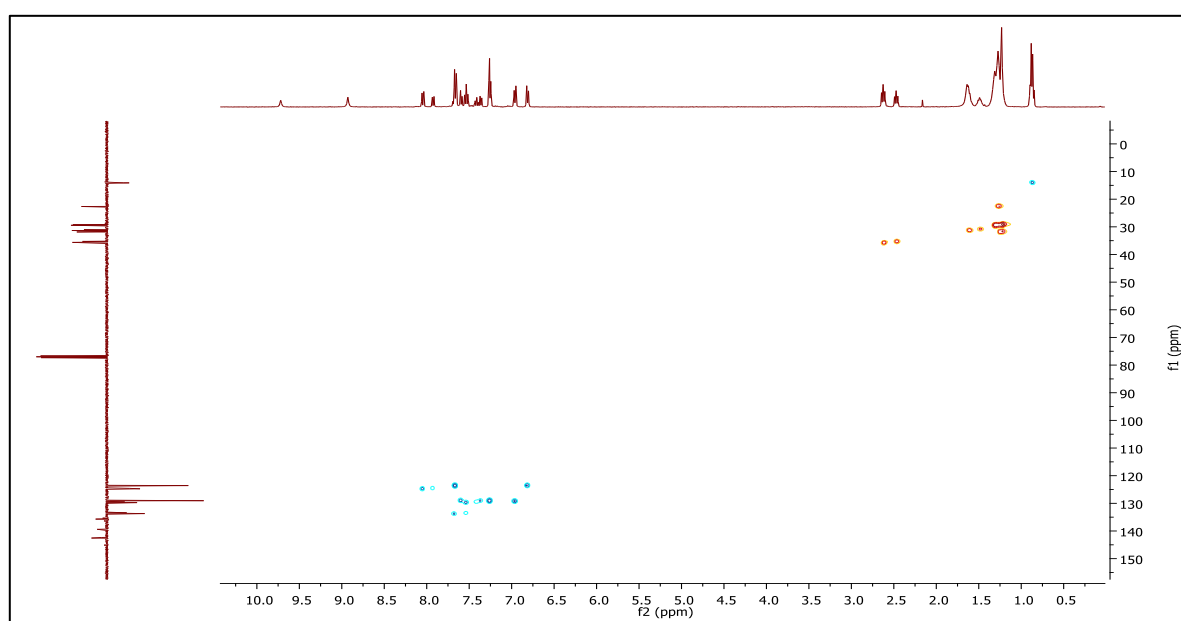


Anexo 43- Espetro de IV do composto 3.c.

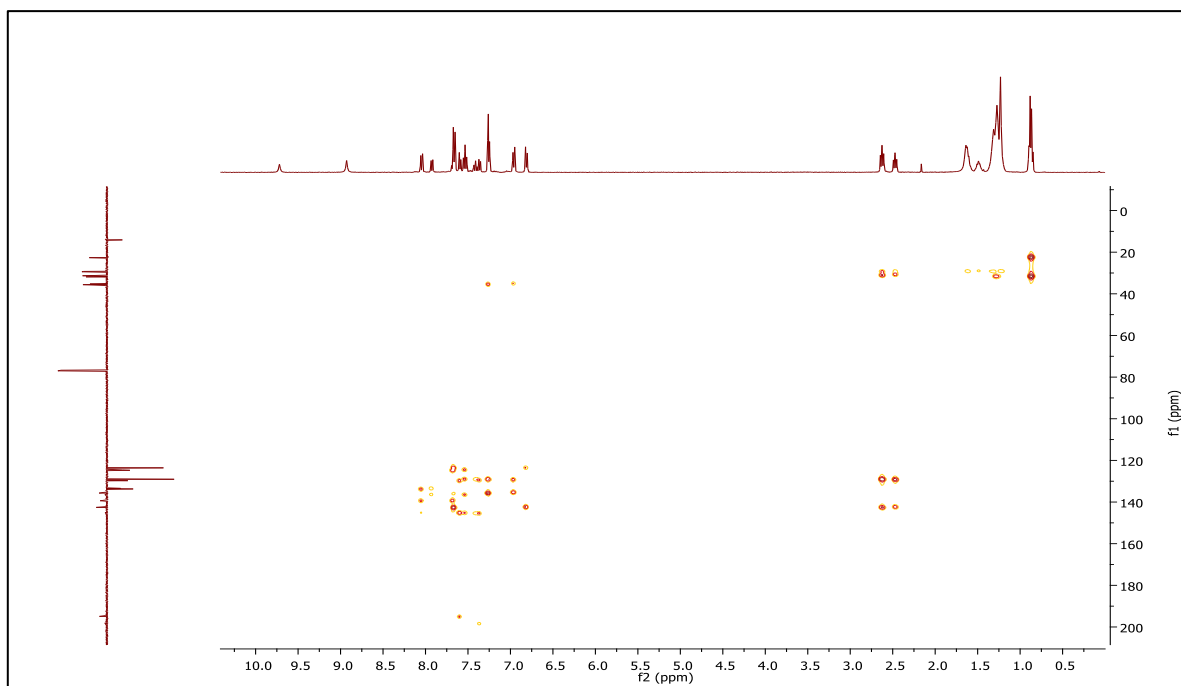




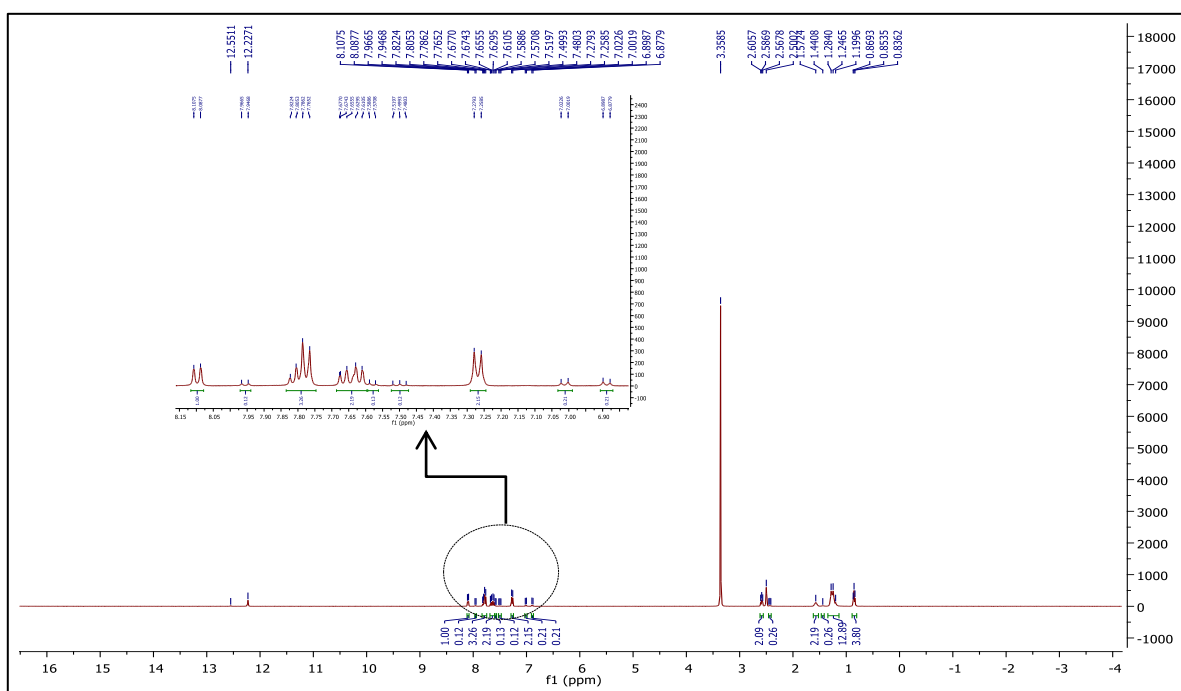
Anexo 46- Espetro COSY do composto4.c, em CDCl_3 .



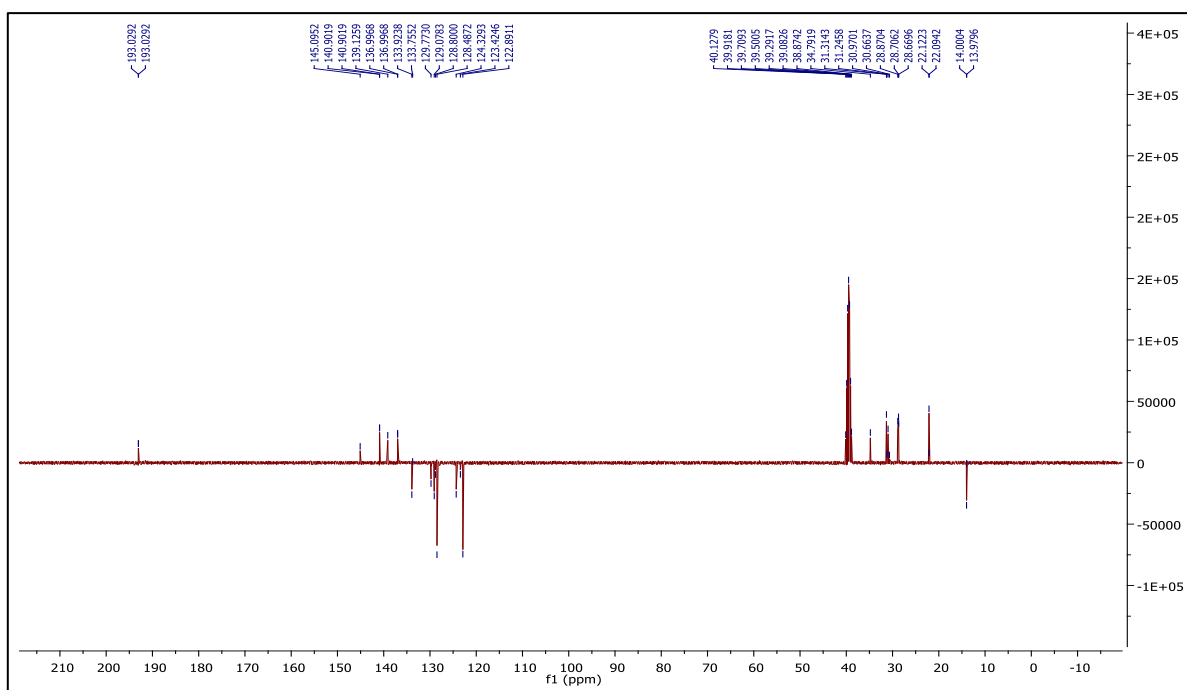
Anexo 47- Espetro HSQC do composto4.c, em CDCl_3 .



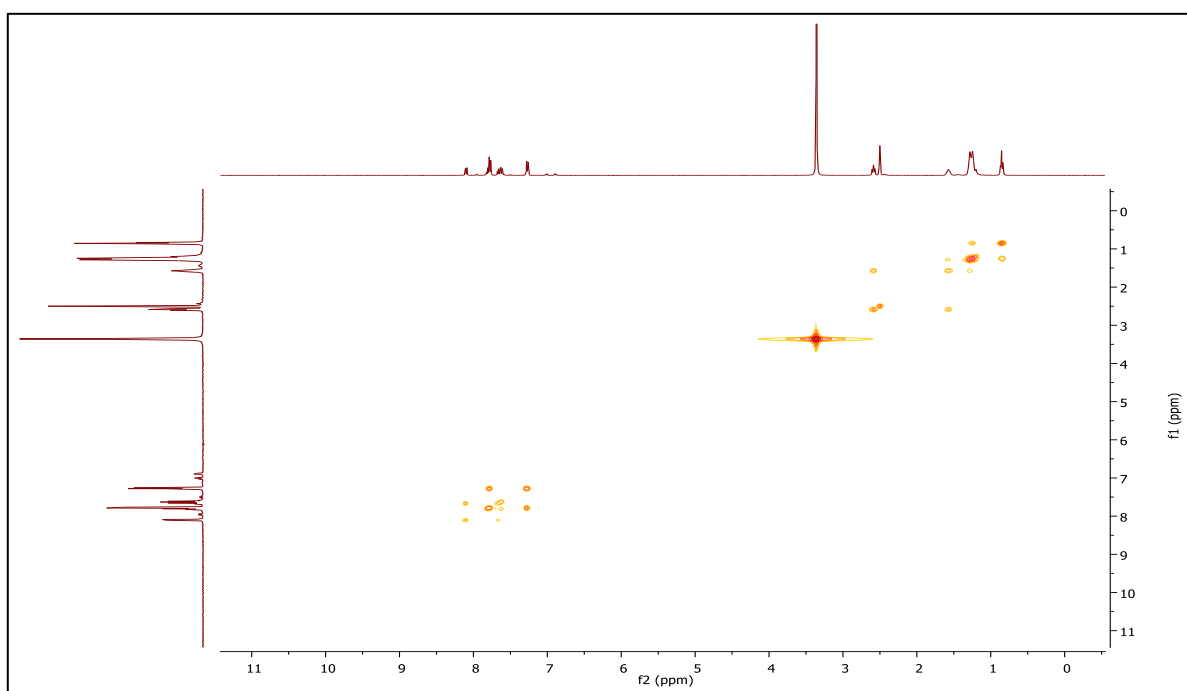
Anexo 48- Espetro HMBC do composto 4.c, em CDCl_3 .



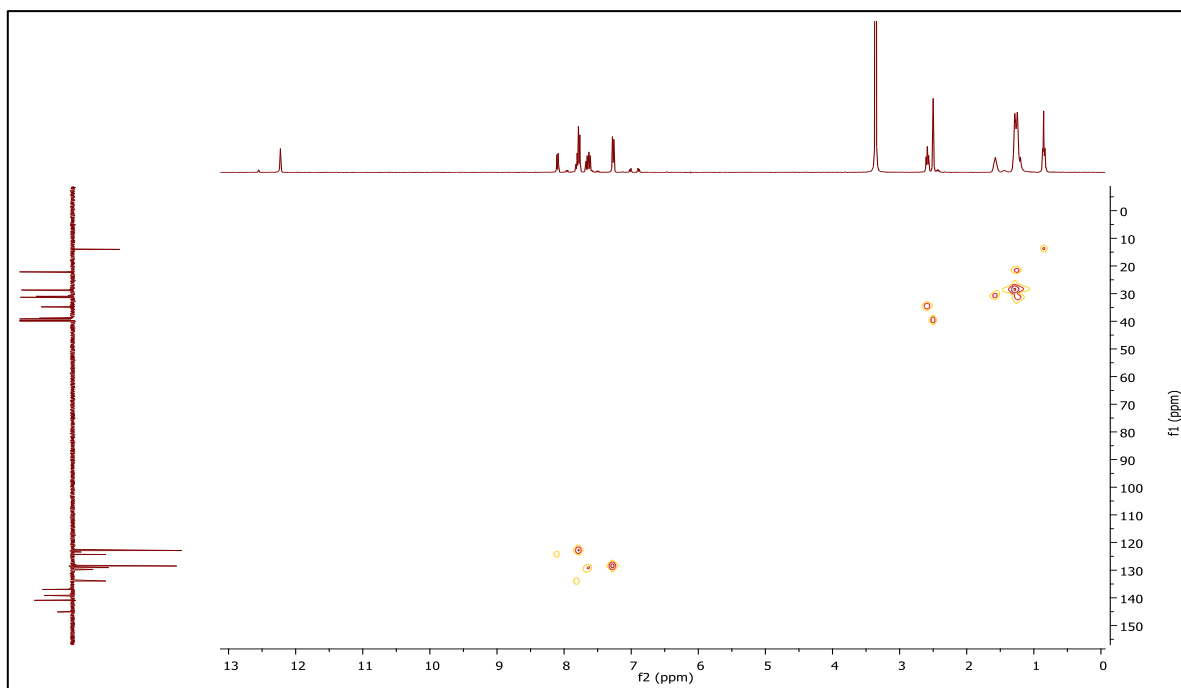
Anexo 49- Espetro de RMN ^1H do composto 4.c, em $\text{DMSO}-d_6$.



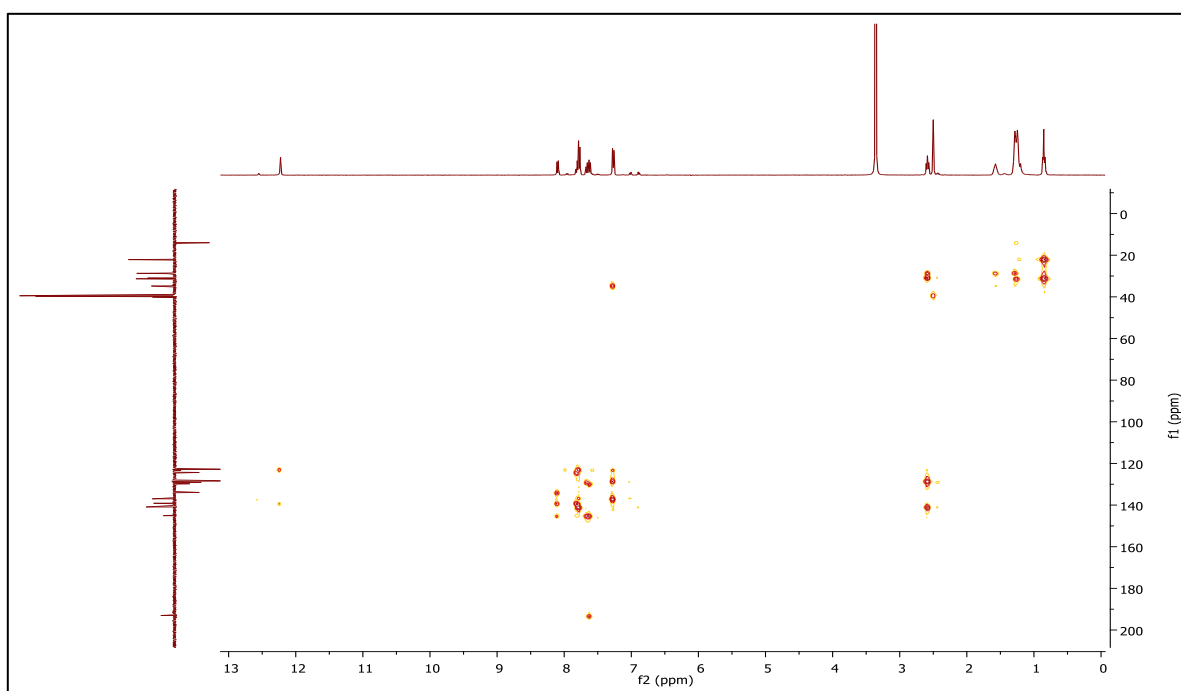
Anexo 50- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.c, em $\text{DMSO-}d_6$.



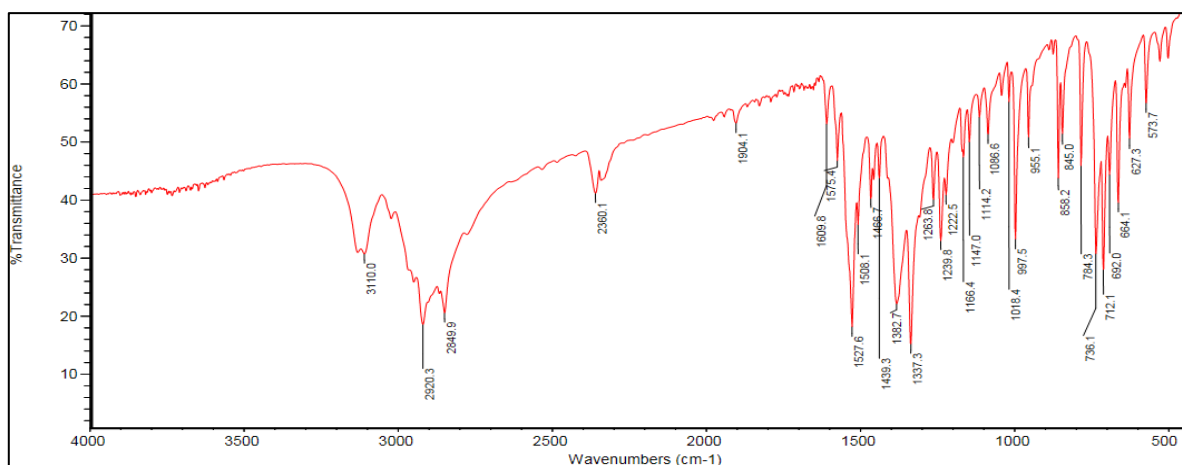
Anexo 51- Espetro COSY do composto 4.c, em $\text{DMSO-}d_6$.



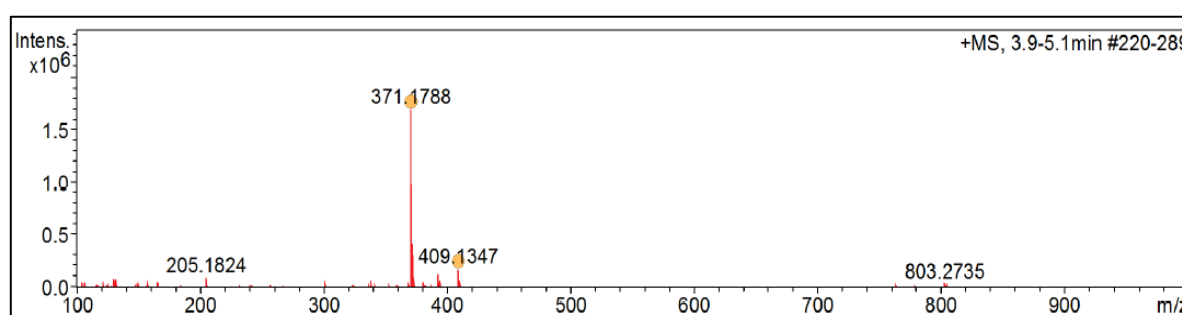
Anexo 52- Espetro HSQC do composto 4.c, em DMSO- d_6 .



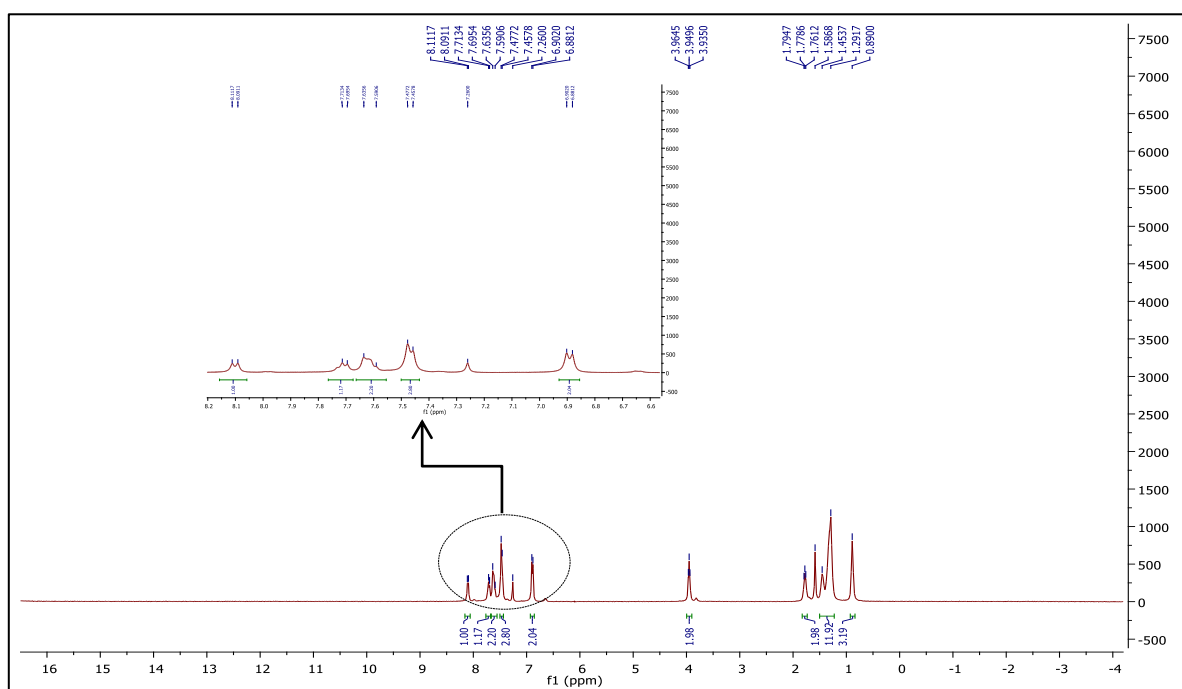
Anexo 53- Espetro HMBC do composto 4.c, em DMSO- d_6 .



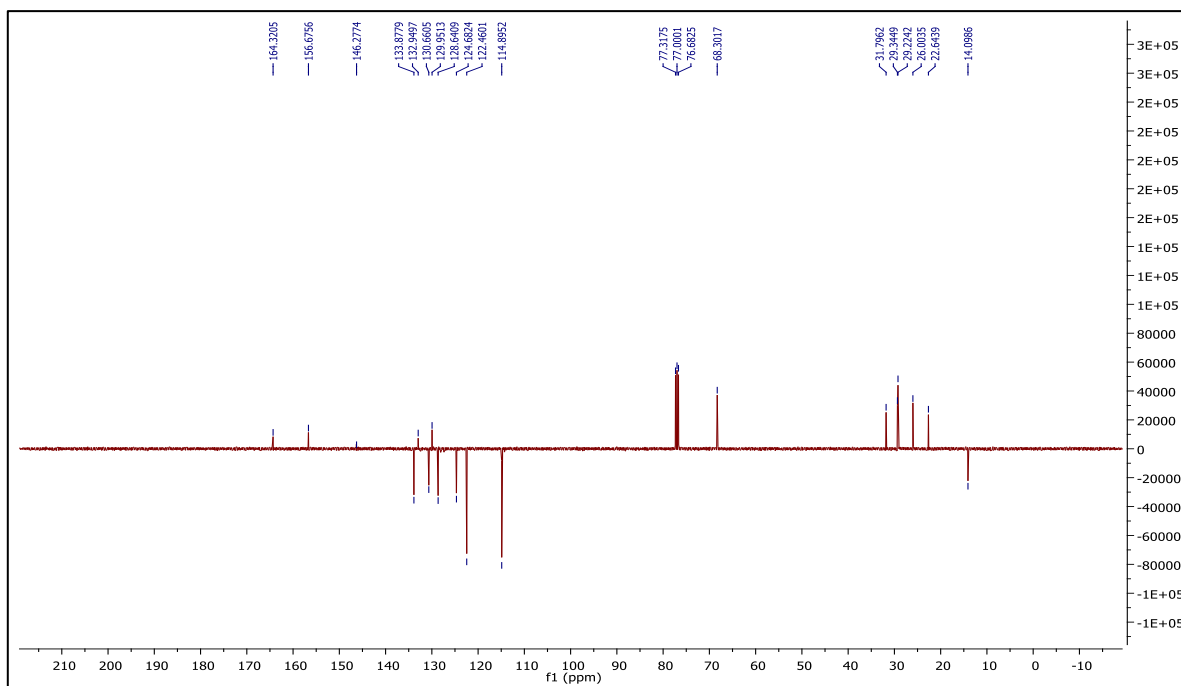
Anexo 54- Espectro de IV do composto 4.c.



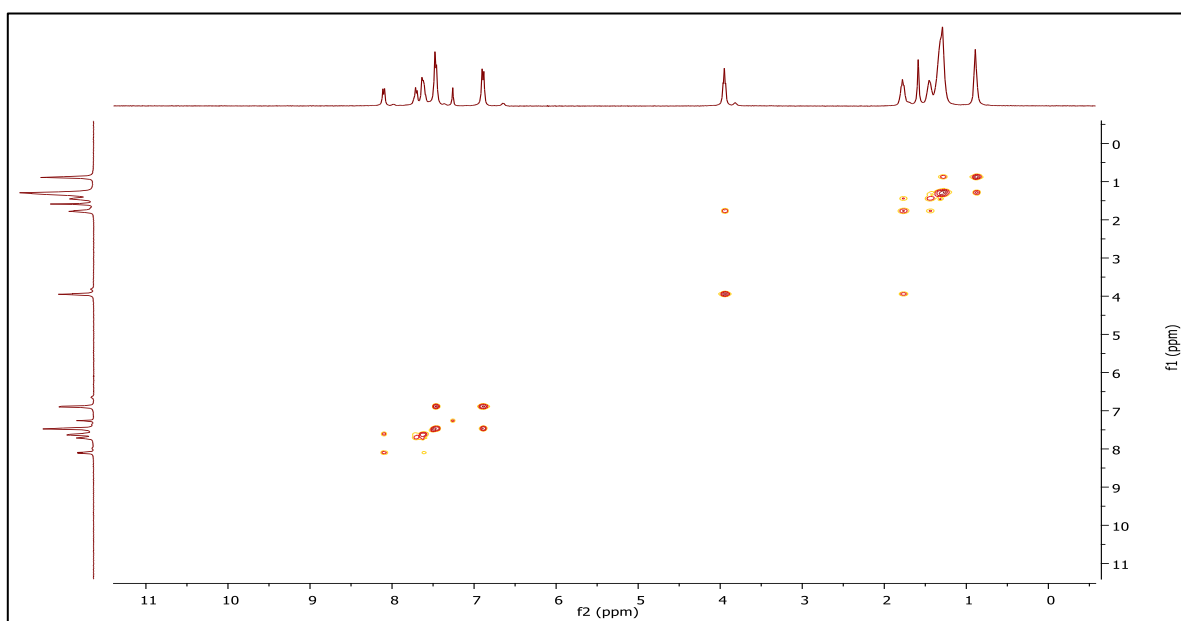
Anexo 55- Espectro de HRMS do composto 4.c.



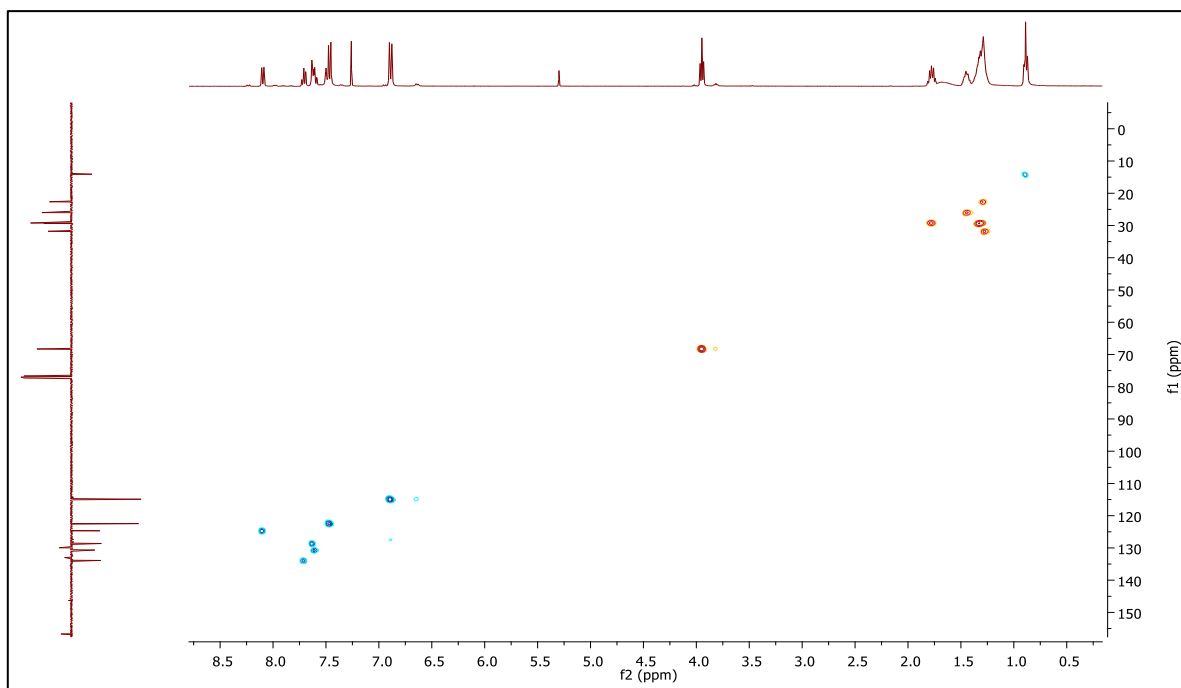
Anexo 56- Espectro de RMN ^1H do composto 3.d, em CDCl_3 .



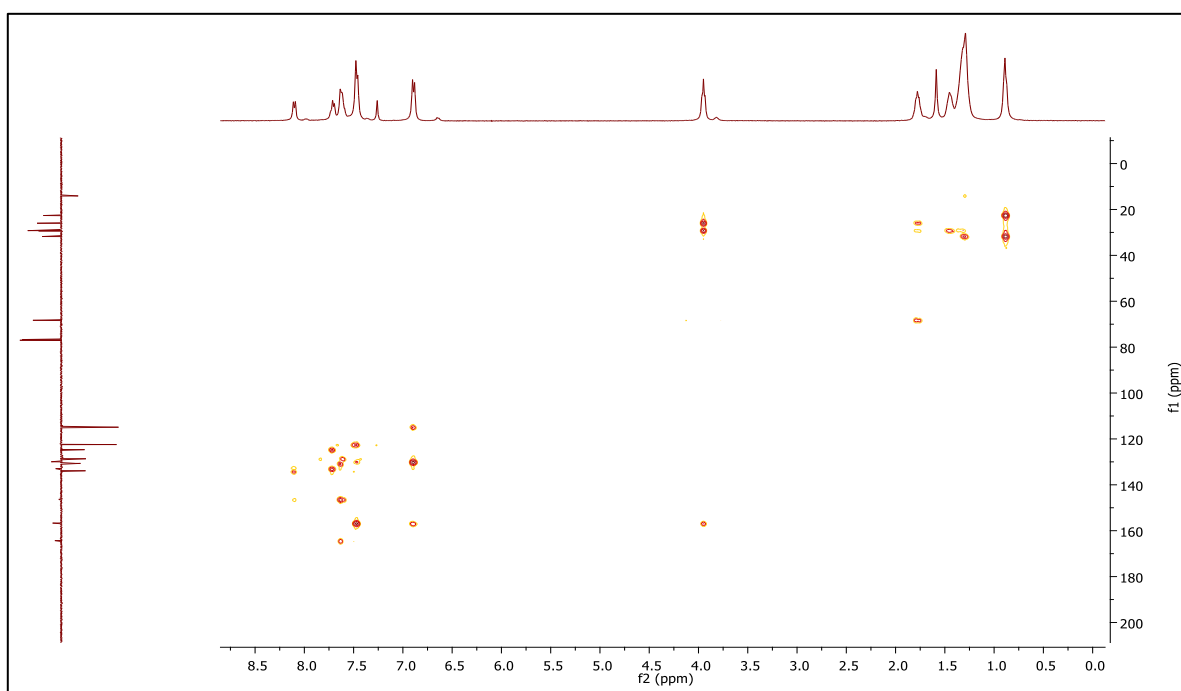
Anexo 57- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.d, em CDCl_3 .



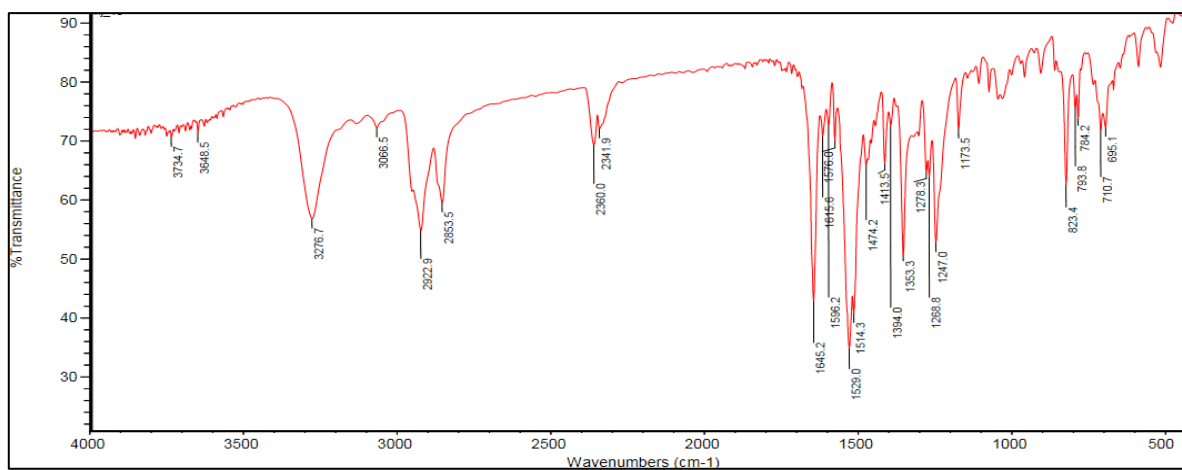
Anexo 58- Espectro COSY do composto 3.d, em CDCl_3 .



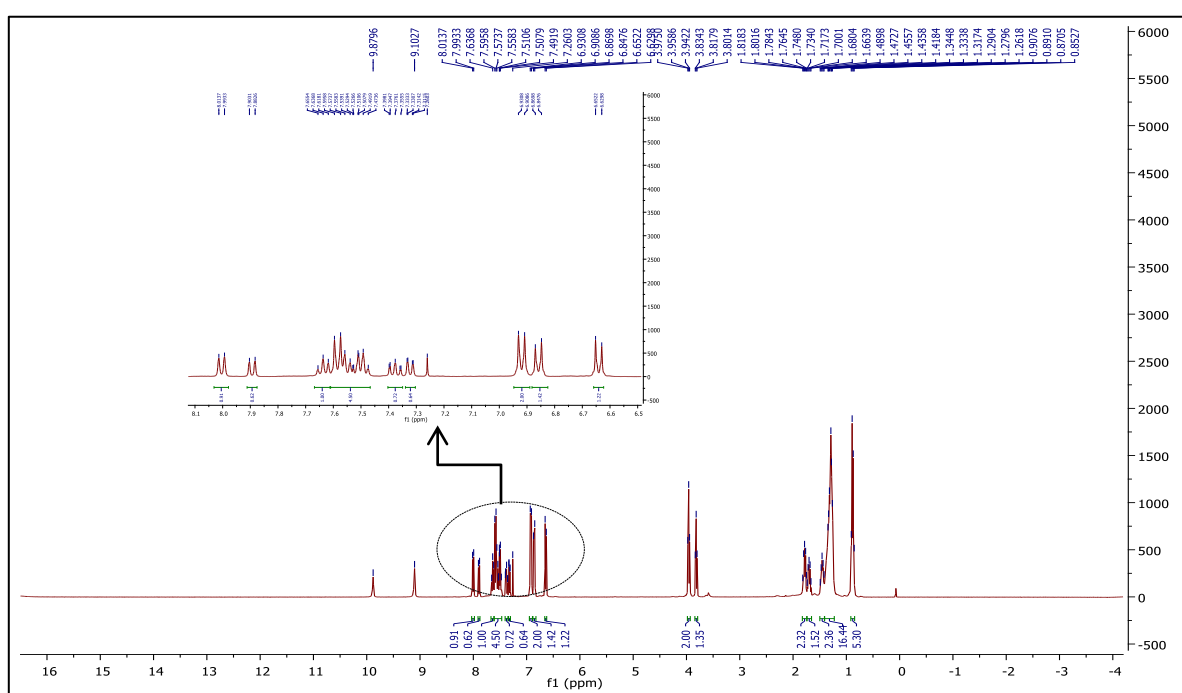
Anexo 59- Espetro HSQC do composto 3.d, em CDCl_3 .



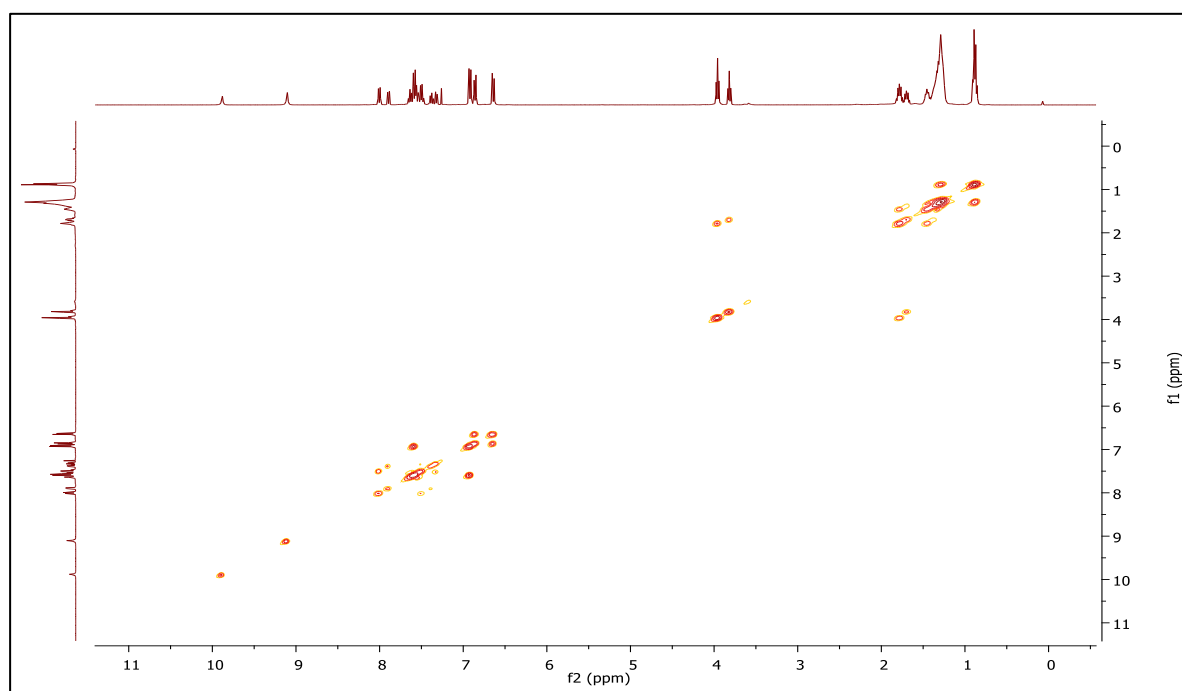
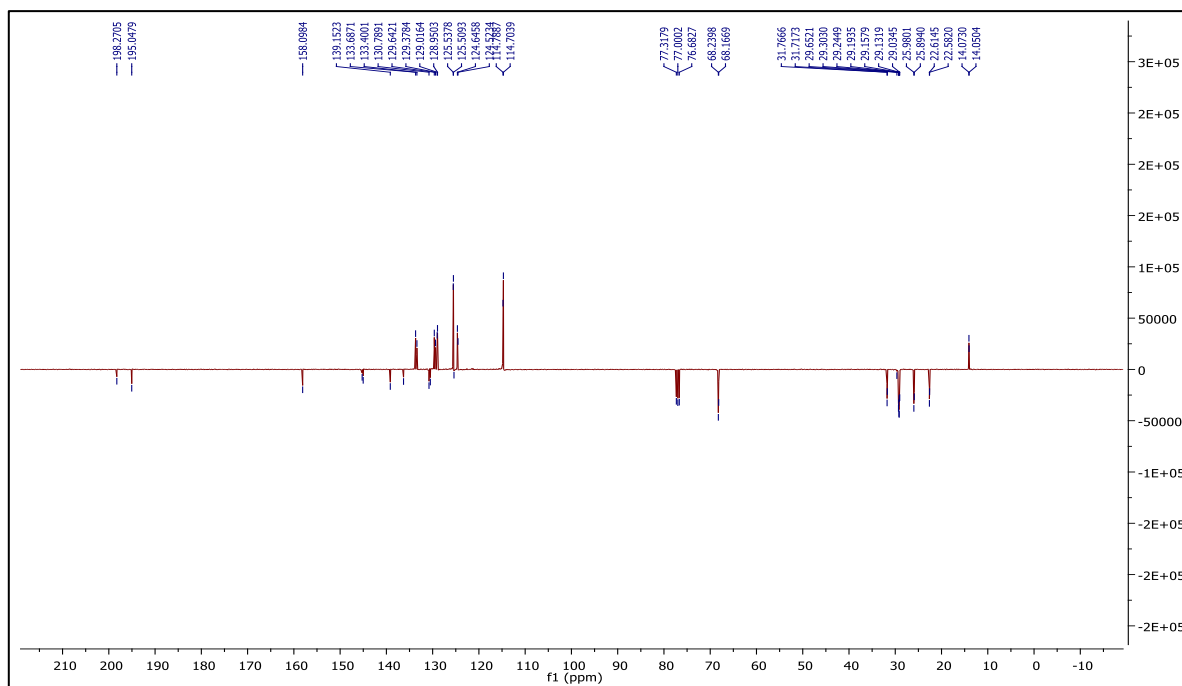
Anexo 60- Espetro HMBC do composto 3.d, em CDCl_3 .

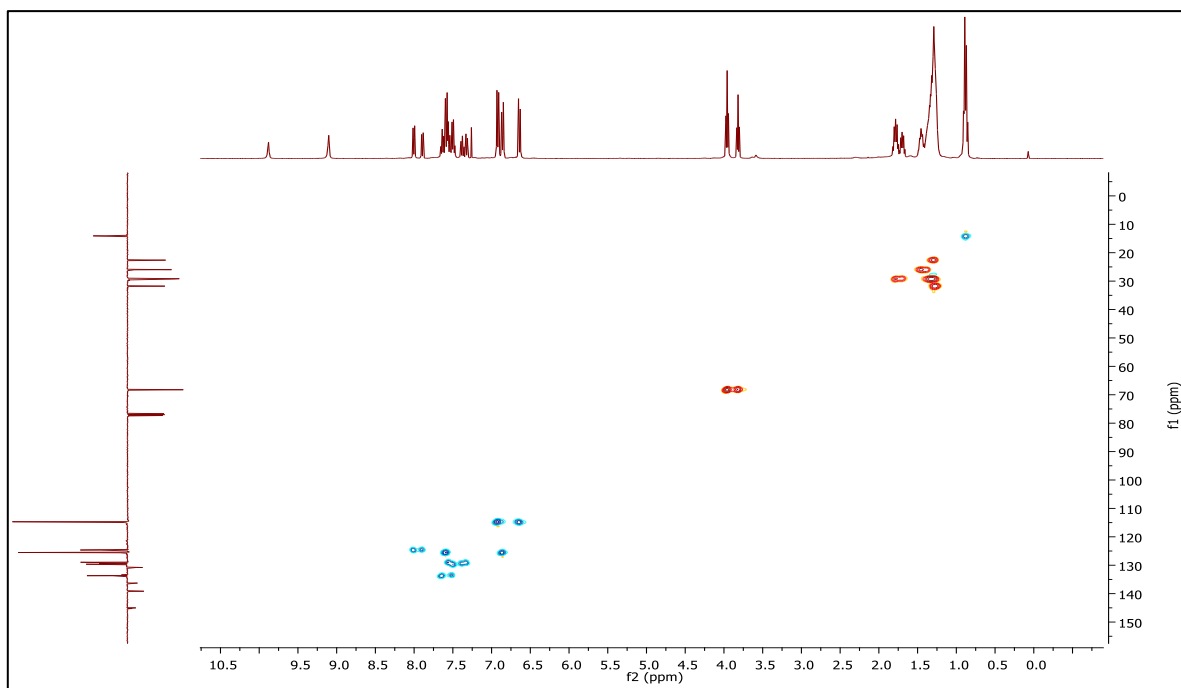


Anexo 61- Espetro de IV do composto 3.d.

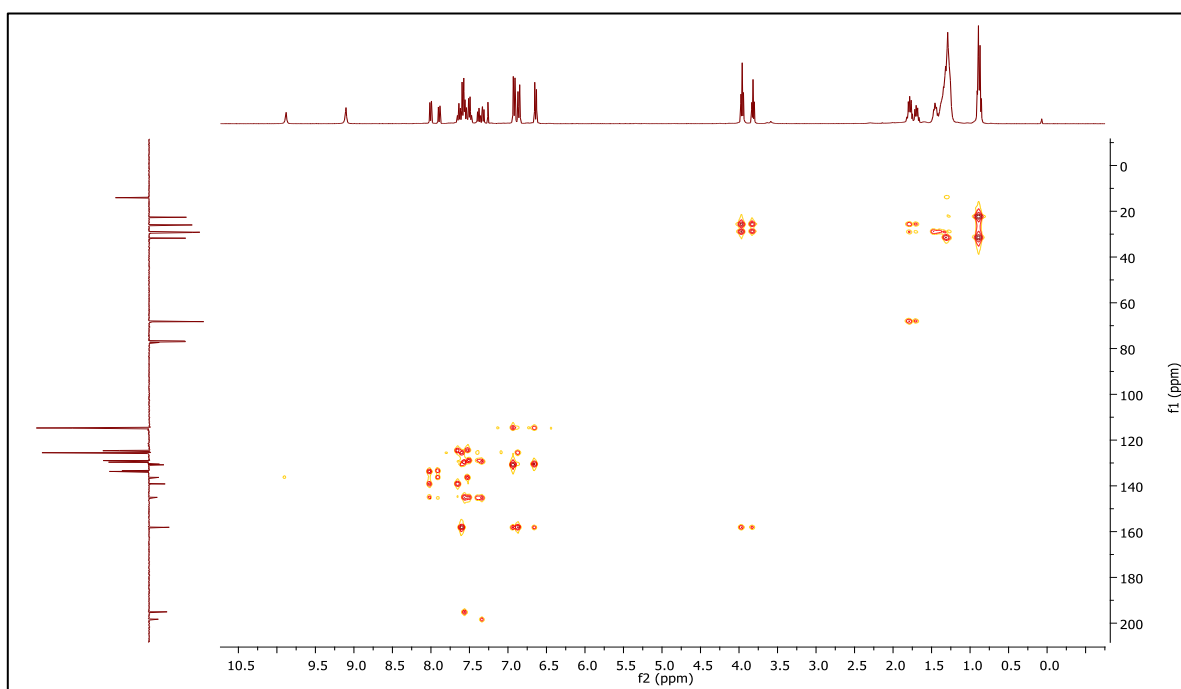


Anexo 62- Espetro de RMN ^1H do composto 4.d, em CDCl_3 .

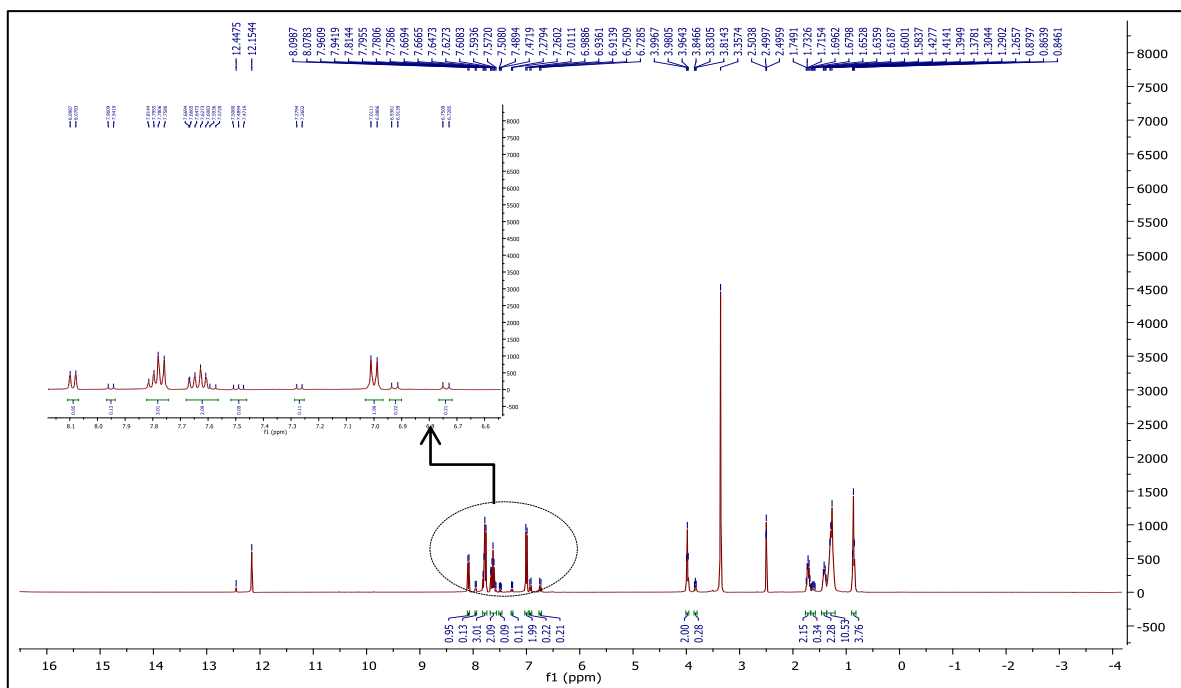


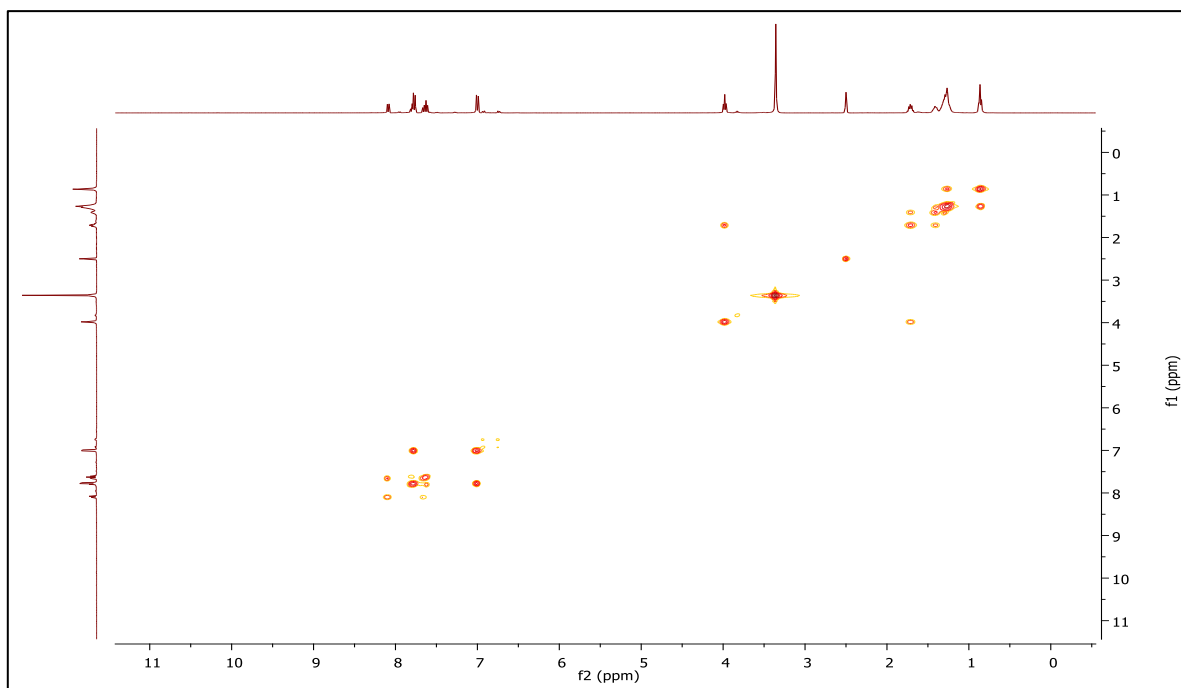


Anexo 65- Espetro HSQC do composto 4.d, em CDCl_3 .

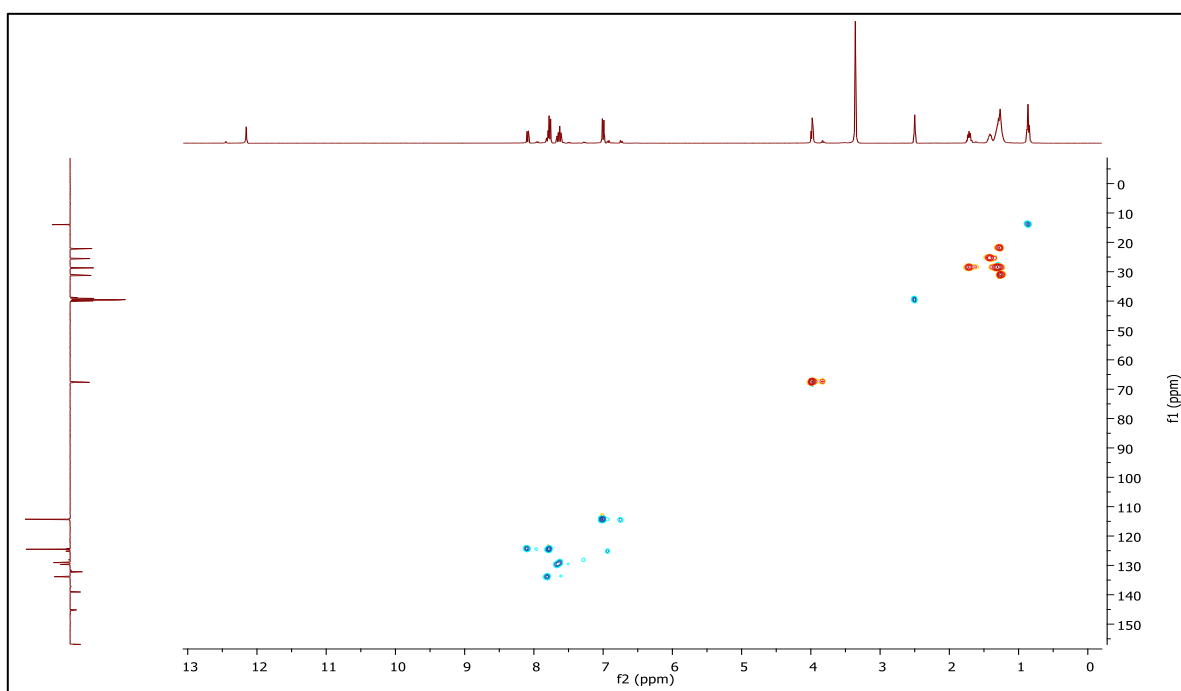


Anexo 66- Espetro HMBC do composto 4.d, em CDCl_3 .

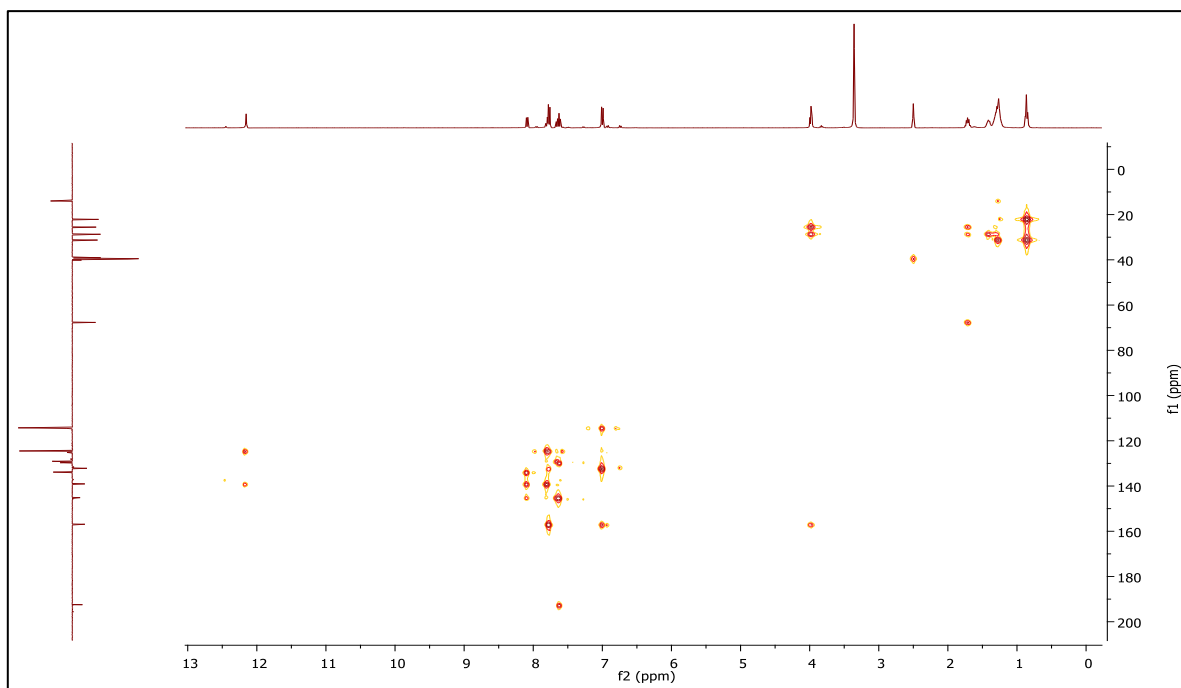




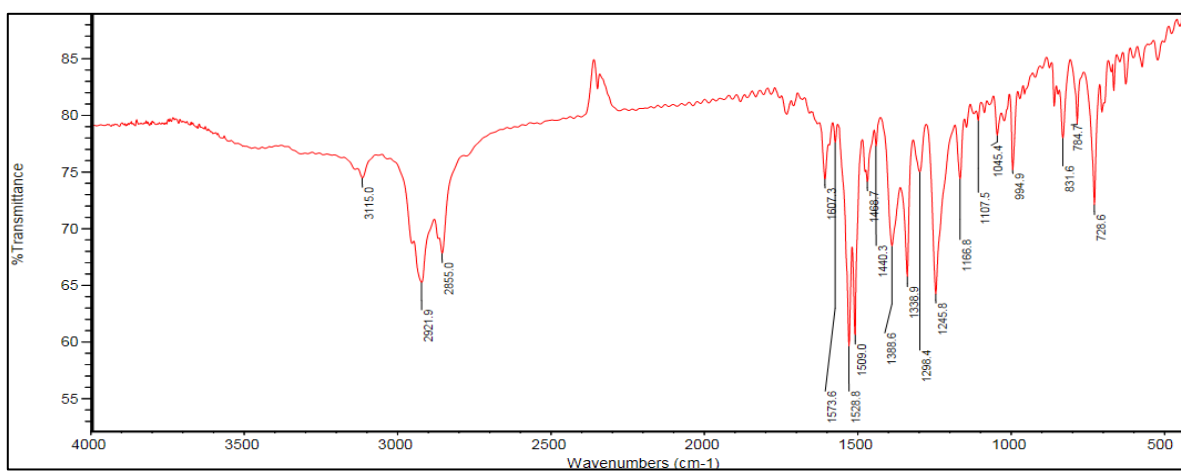
Anexo 69- Espetro COSY do composto 4.d, em DMSO- d_6 .



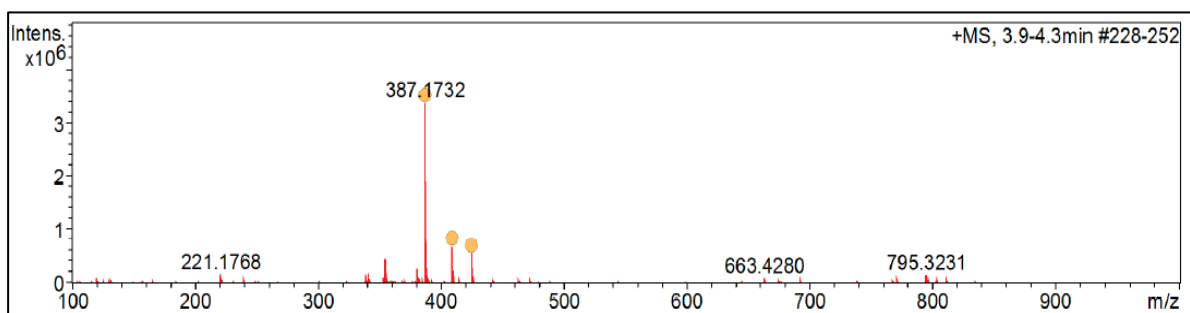
Anexo 70- Espetro HSQC do composto 4.d, em DMSO- d_6 .



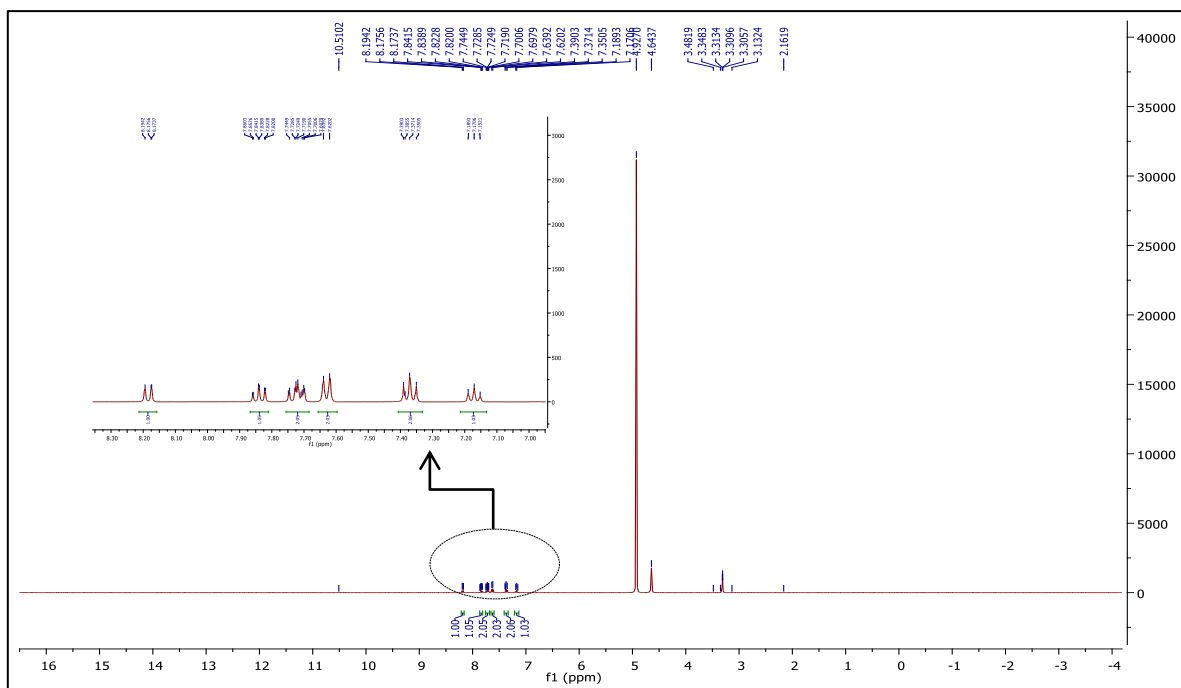
Anexo 71- Espetro HMBC do composto 4.d, em DMSO- d_6 .



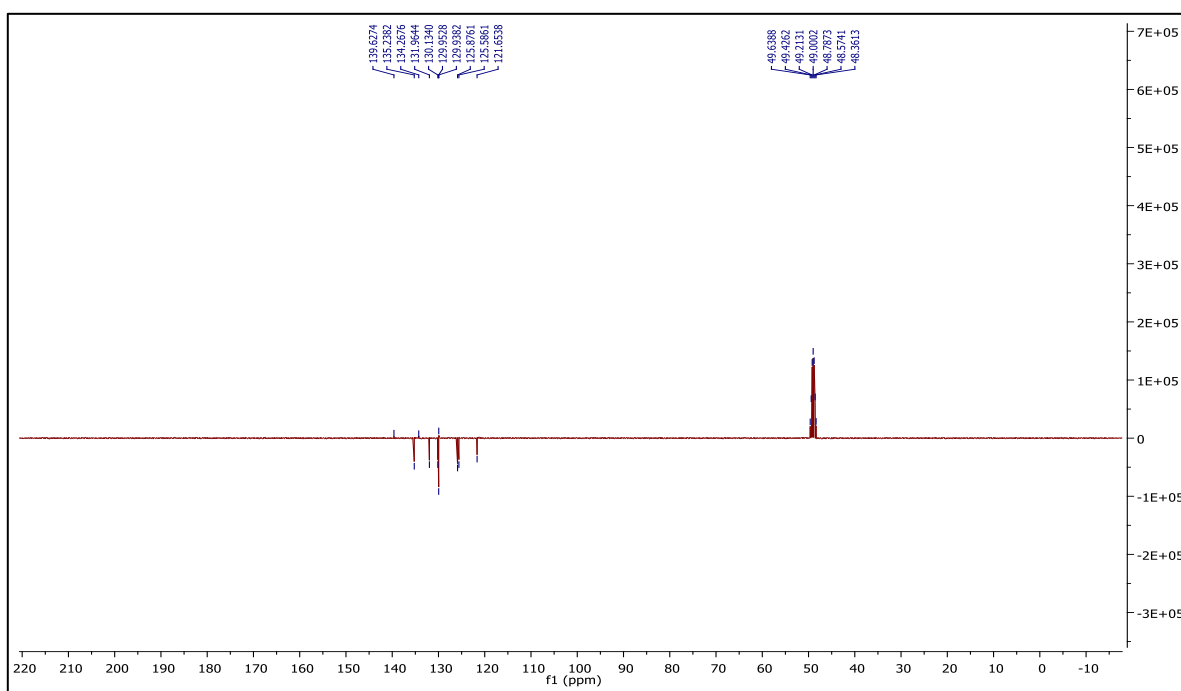
Anexo 72- Espetro de IV do composto 4.d.



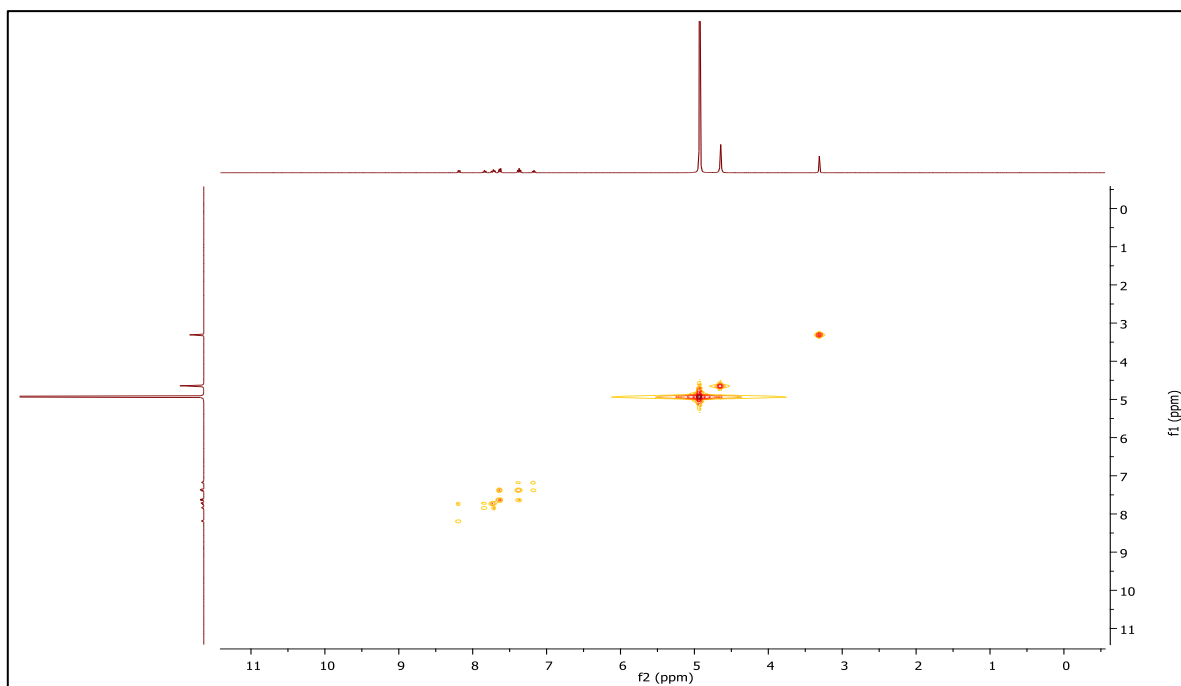
Anexo 73. Espetro de HRMS do composto 4.d.



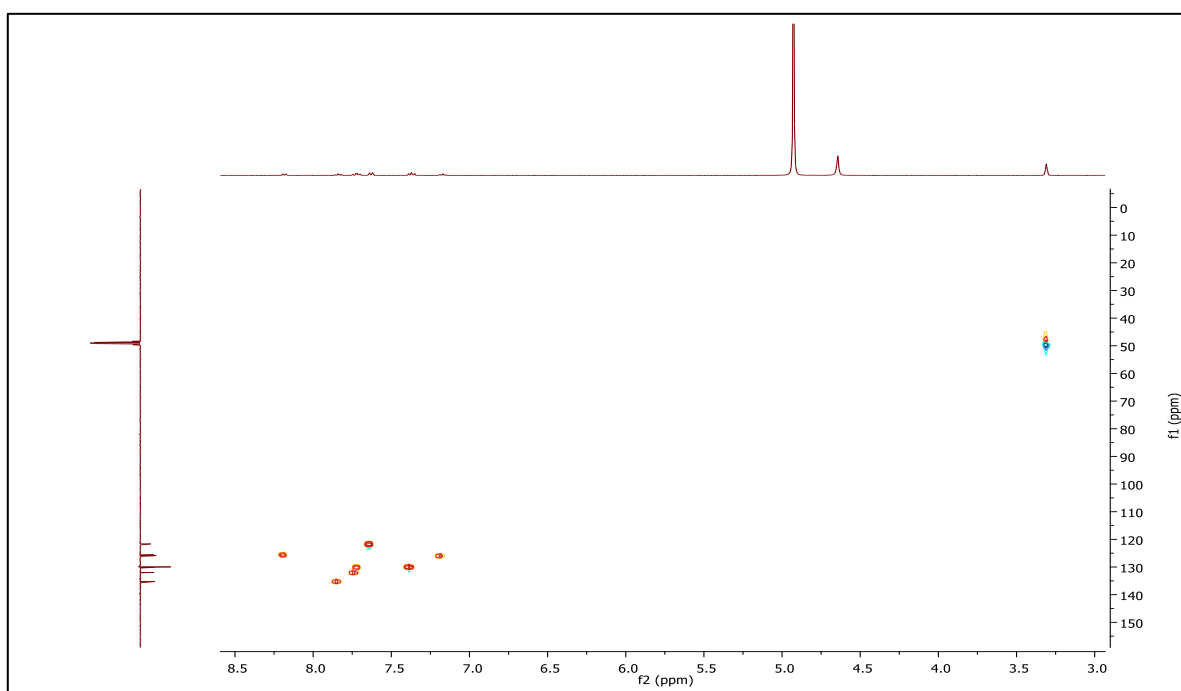
Anexo 74- Espectro de RMN ^1H do composto 3.e, em CD_3CD .



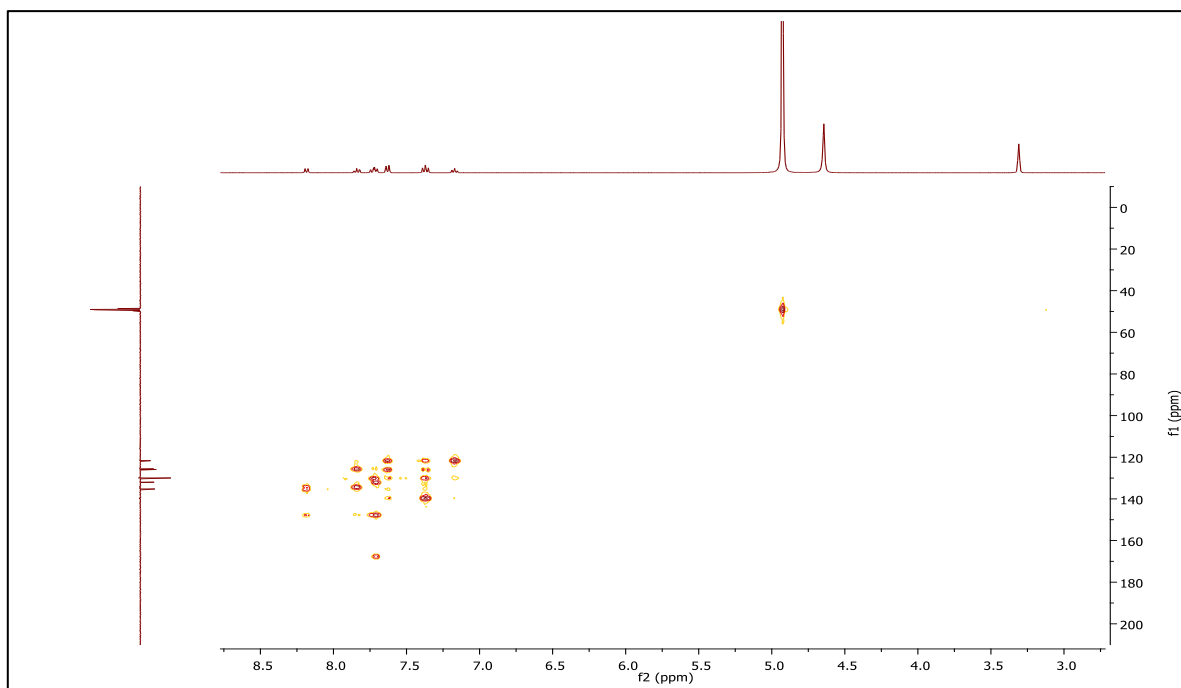
Anexo 75- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.e, em CD_3CD .



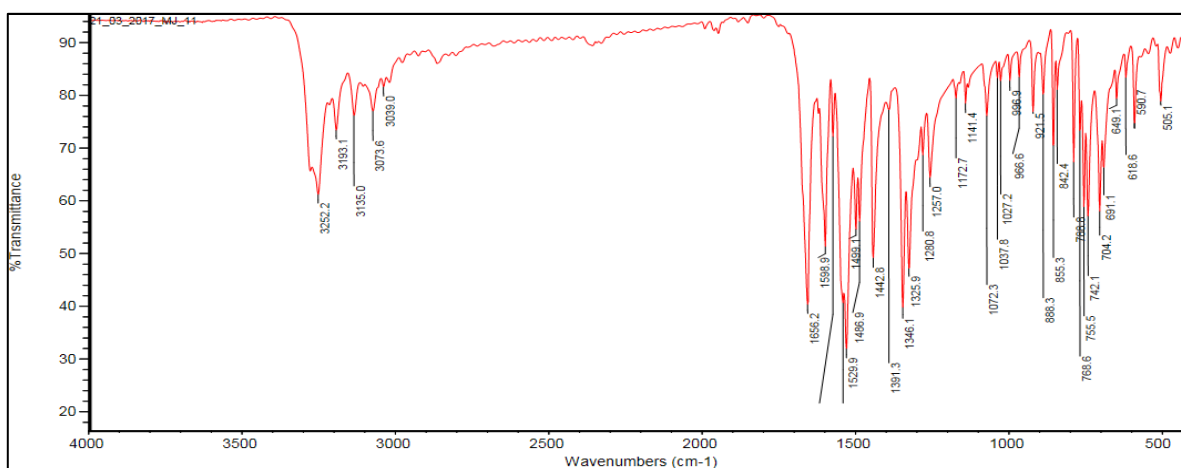
Anexo 76- Espetro COSY do composto 3.e, em CD₃CD.



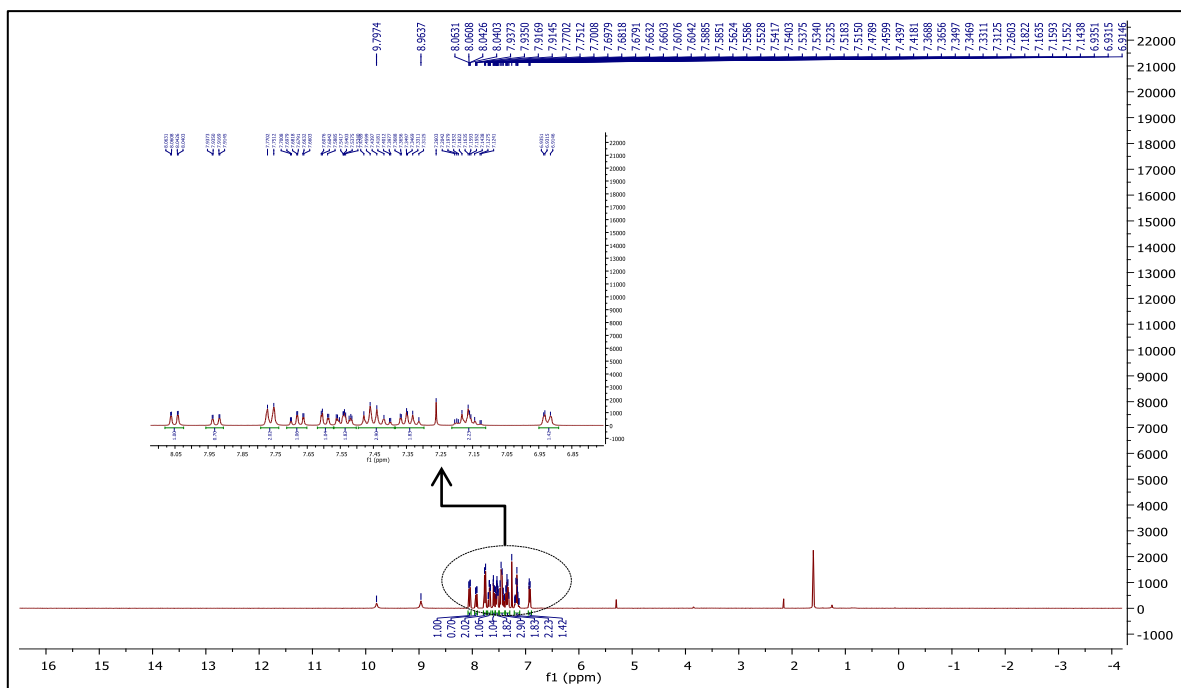
Anexo 77- Espetro HSQC do composto 3.e, em CD₃CD.



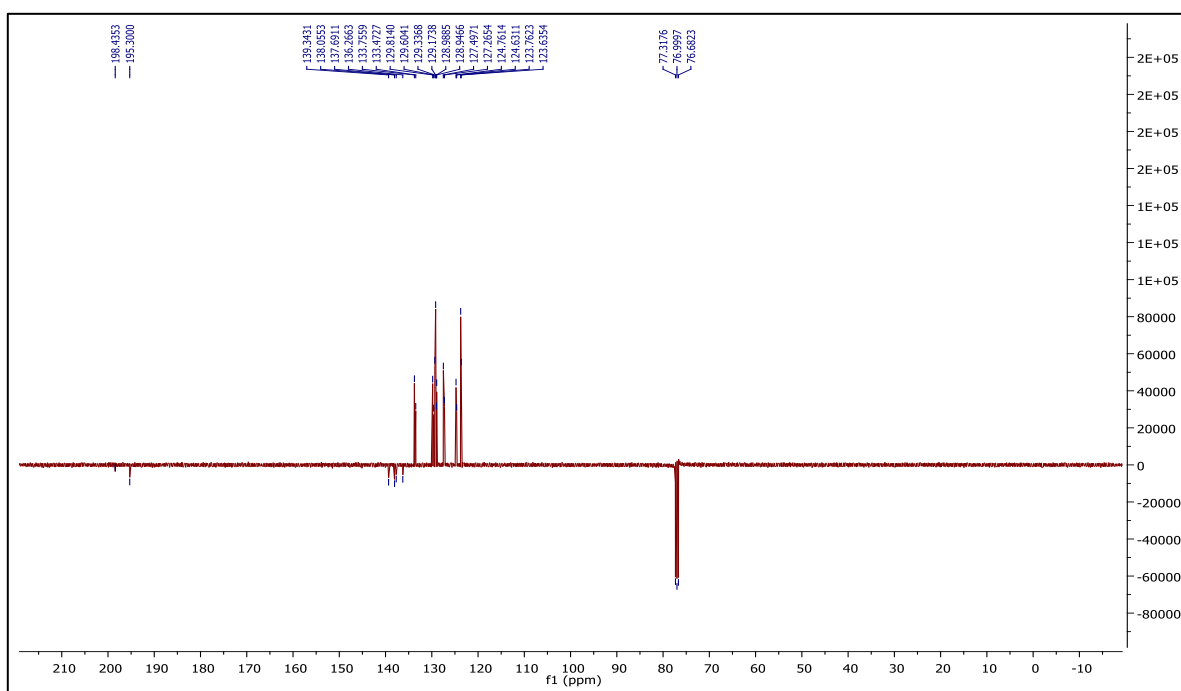
Anexo 78- Espetro HMBC do composto 3.e, em CD_3CD .



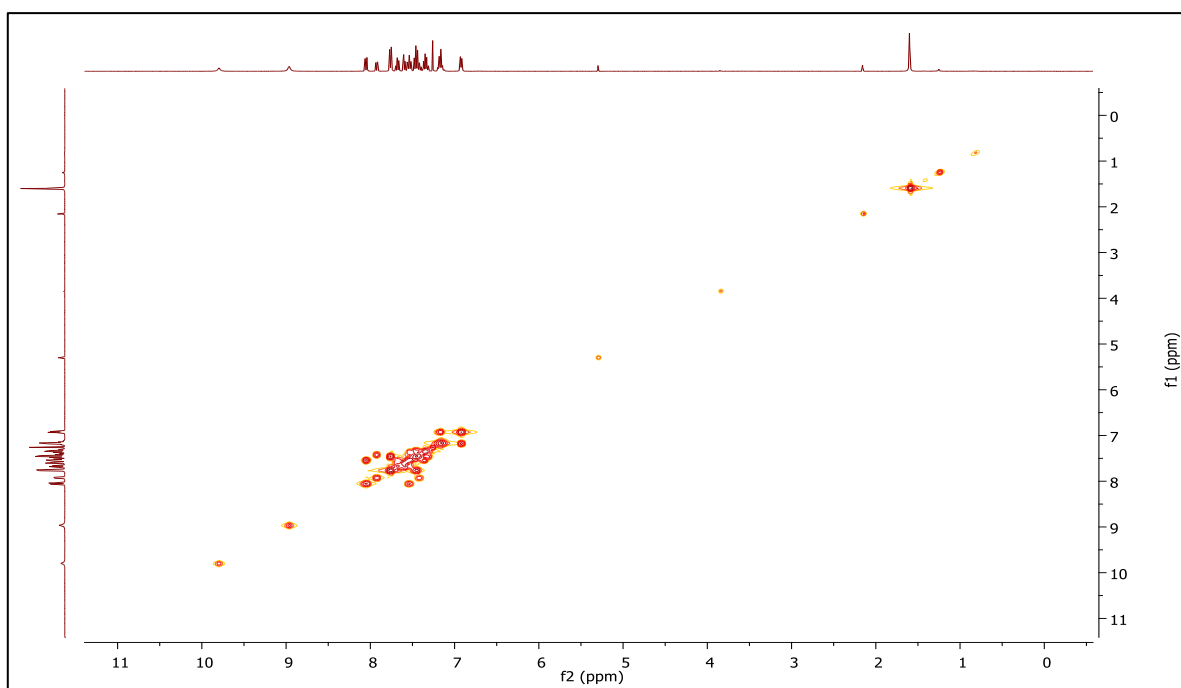
Anexo 79- Espetro de IV do composto 3.e.



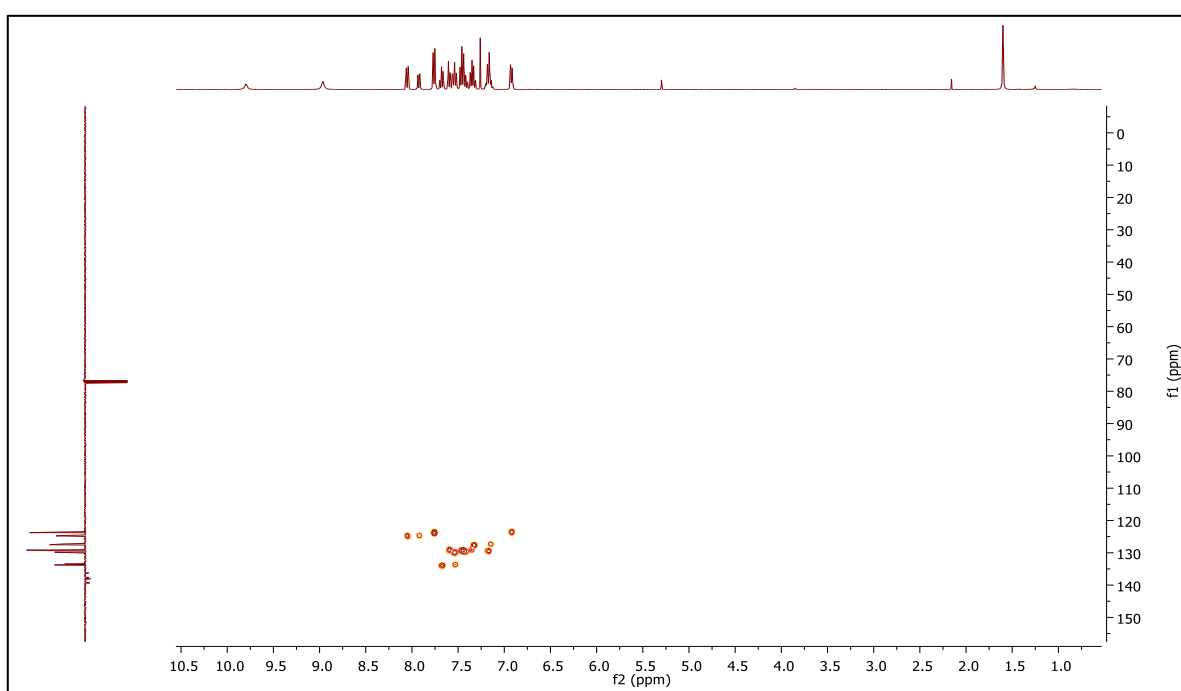
Anexo 80- Espectro de RMN ^1H do composto 4.e, em CDCl_3 .



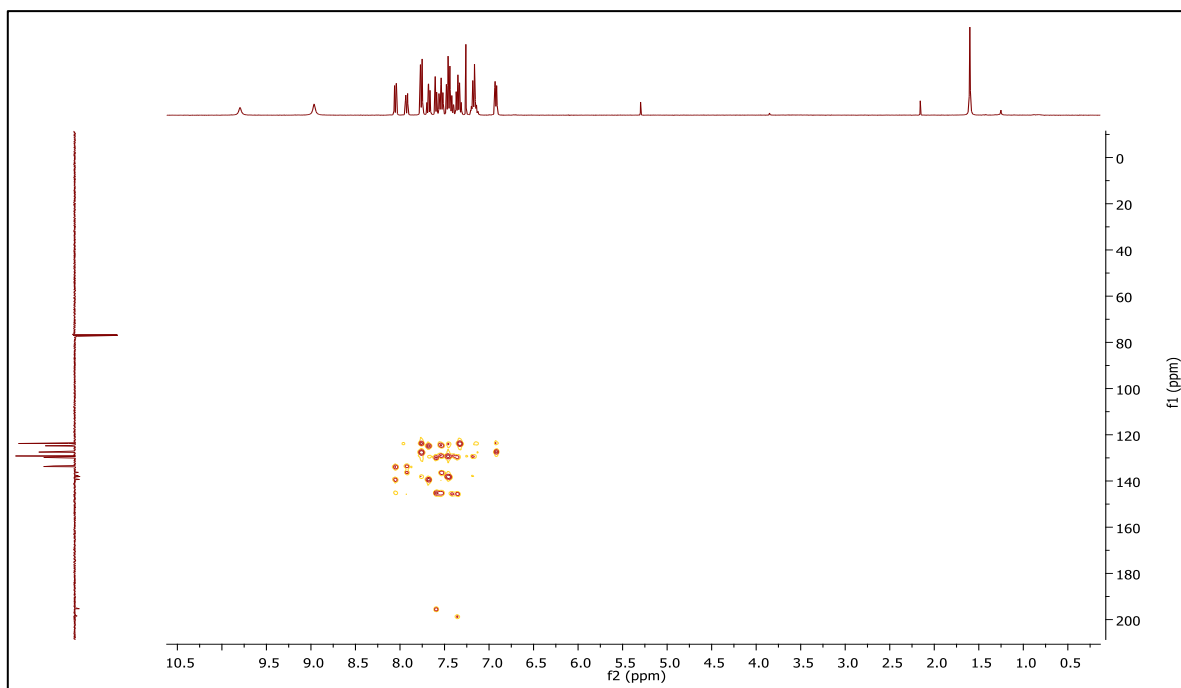
Anexo 81- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.e, em CDCl_3 .



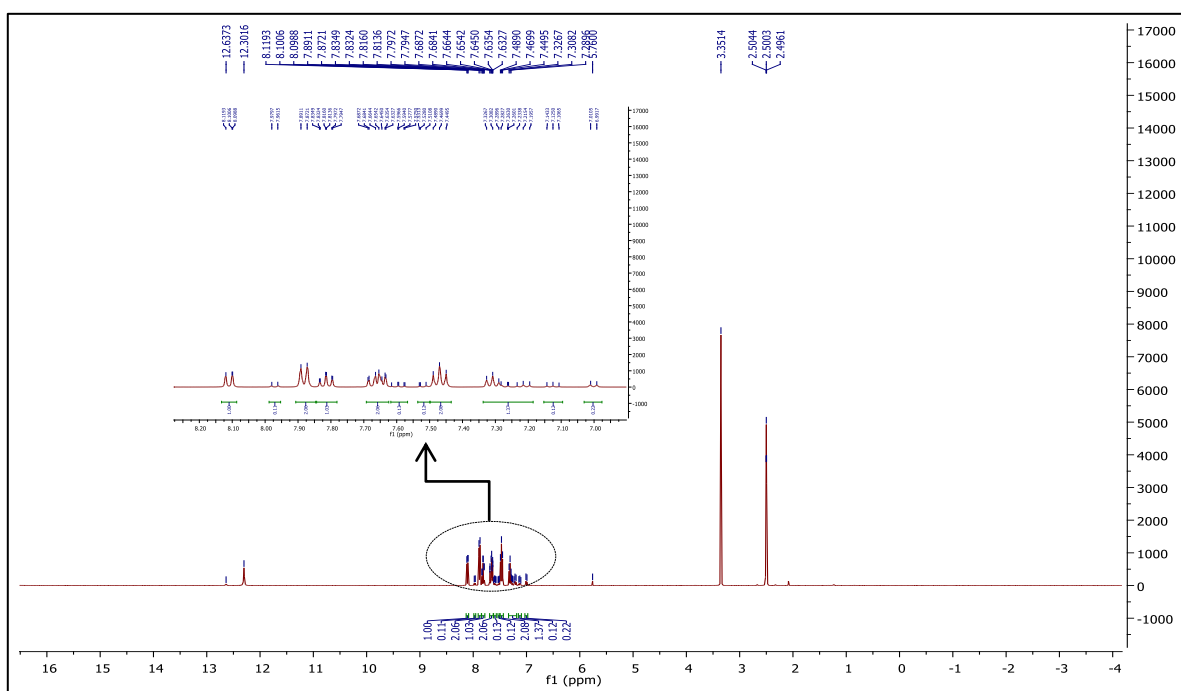
Anexo 82- Espetro COSY do composto 4.e, em CDCl_3 .



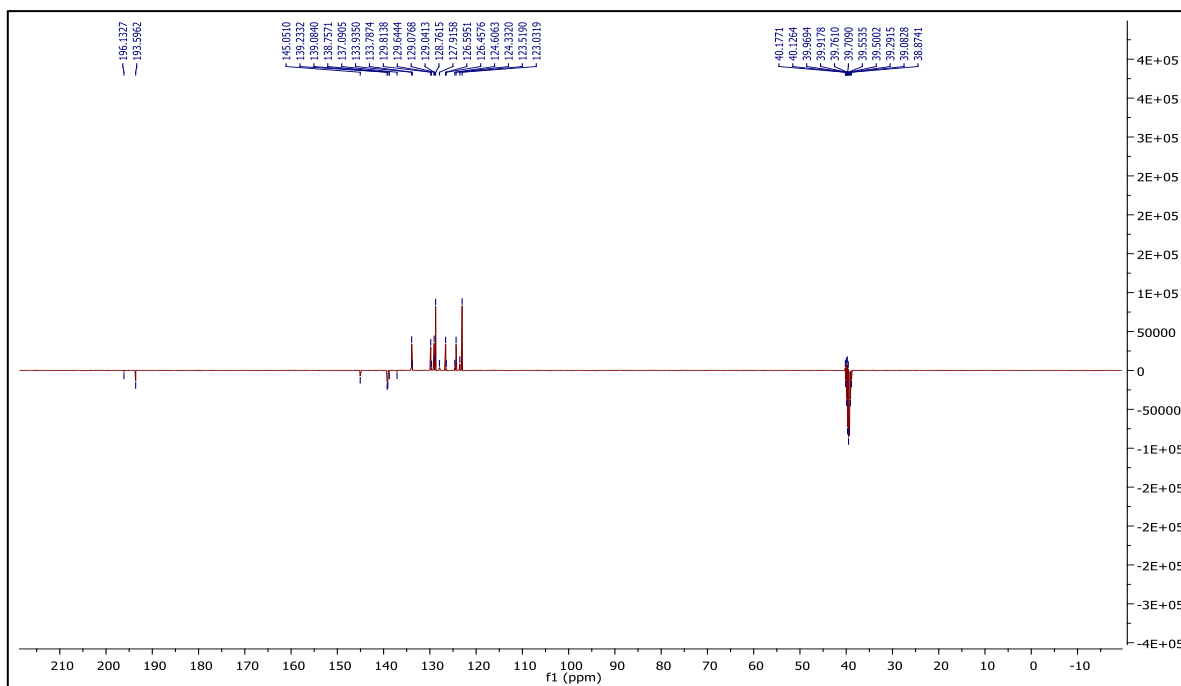
Anexo 83- Espetro HSQC do composto 4.e, em CDCl_3 .



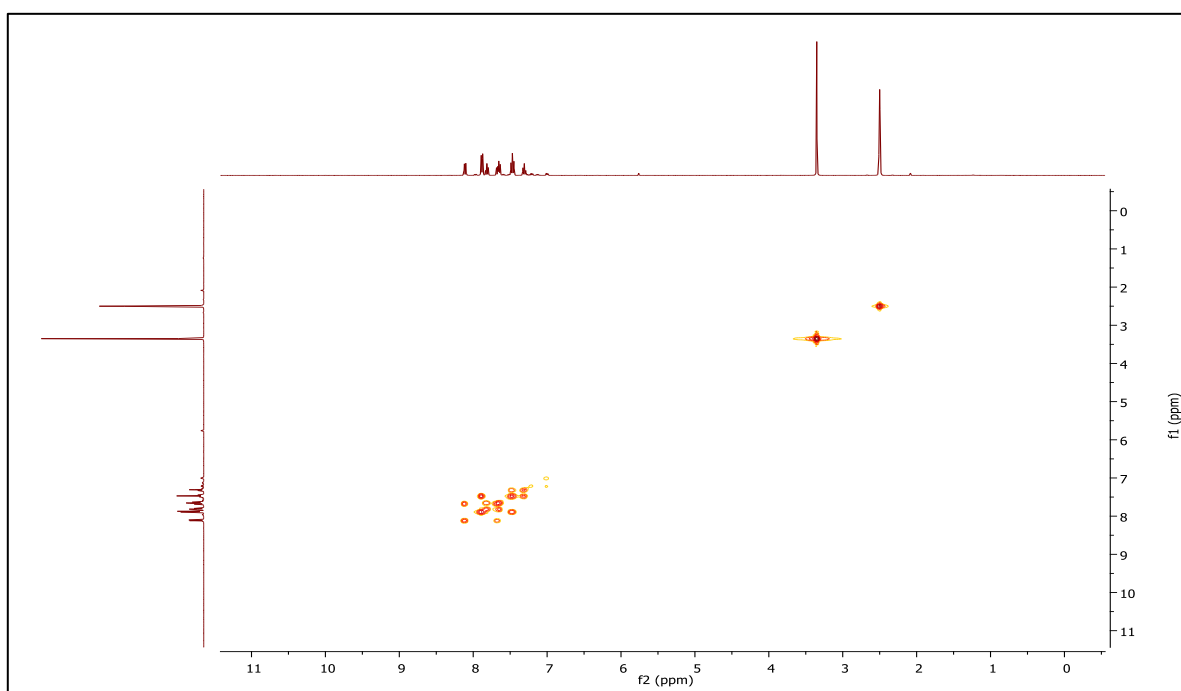
Anexo 84- Espectro HMBC do composto 4.e, em CDCl_3 .

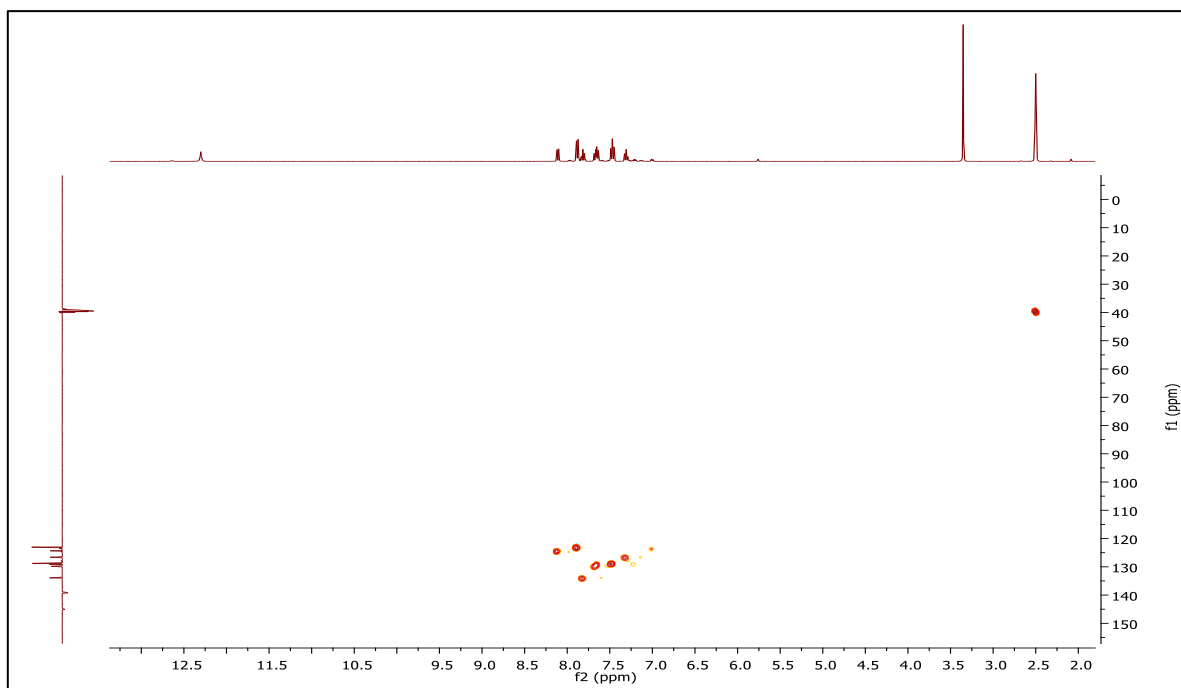


Anexo 85- Espectro de RMN ^1H do composto 4.e, em $\text{DMSO}-d_6$.

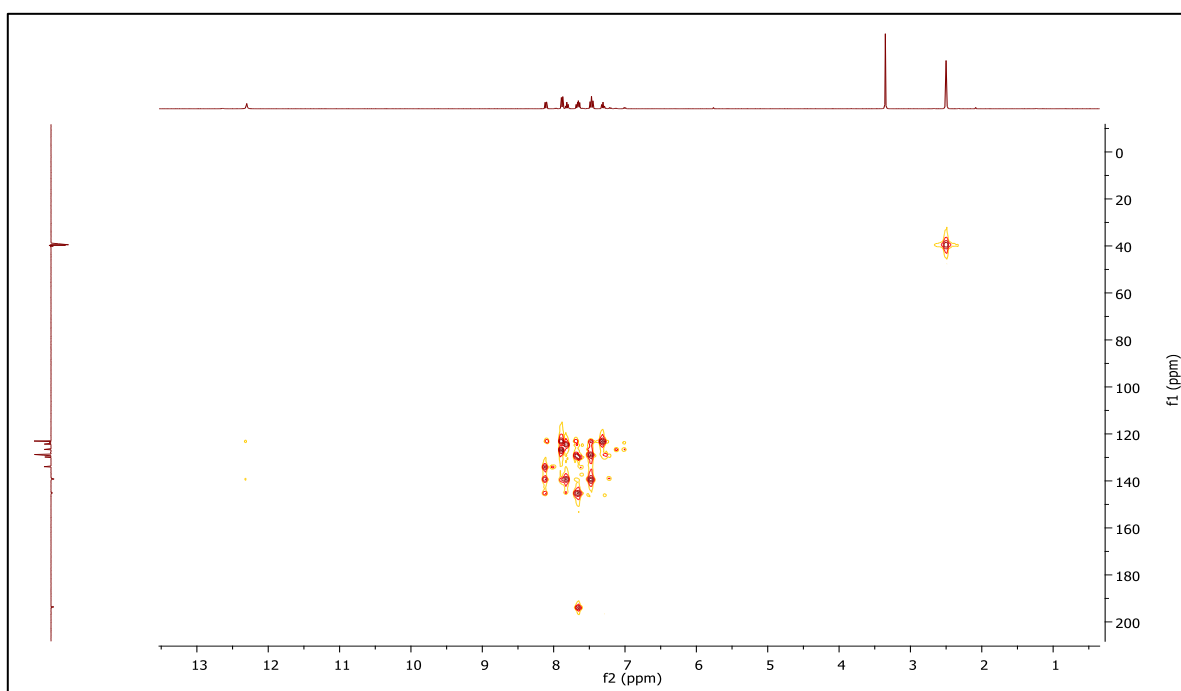


Anexo 86- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.e, em $\text{DMSO-}d_6$.

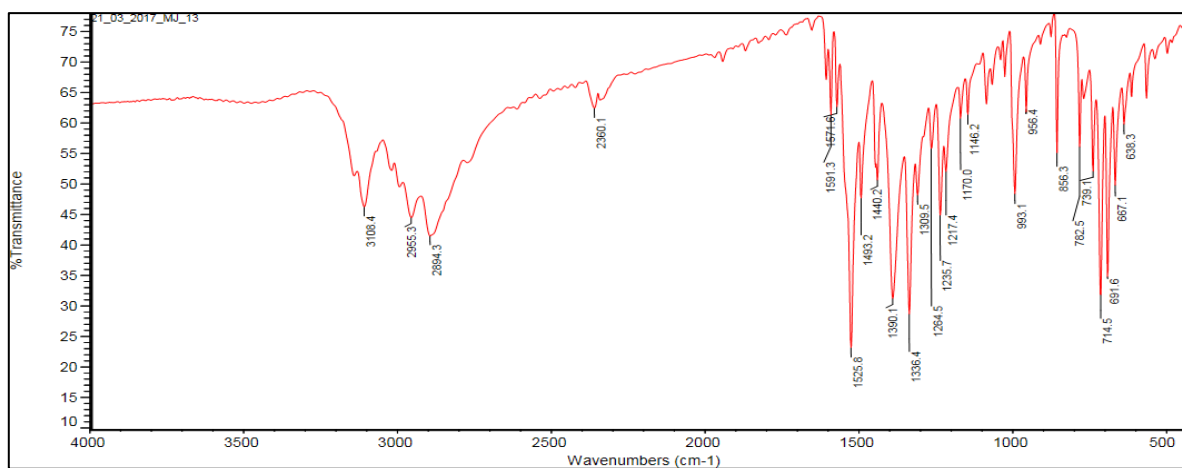




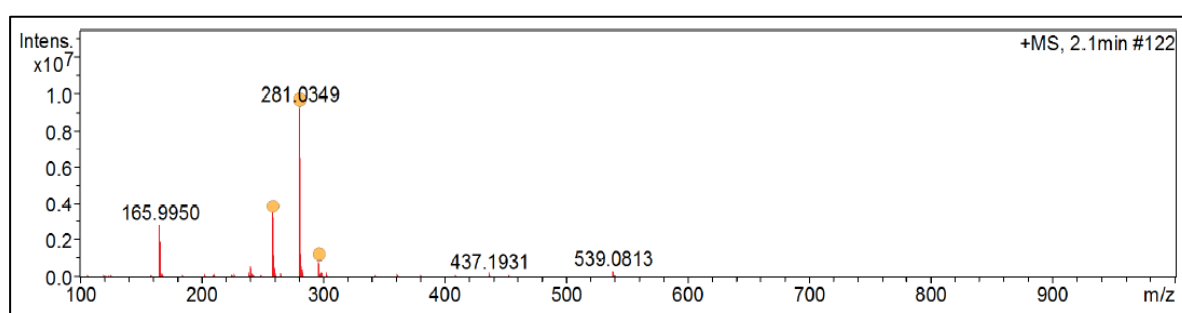
Anexo 88- Espetro HSQC do composto 4.e, em DMSO- d_6 .



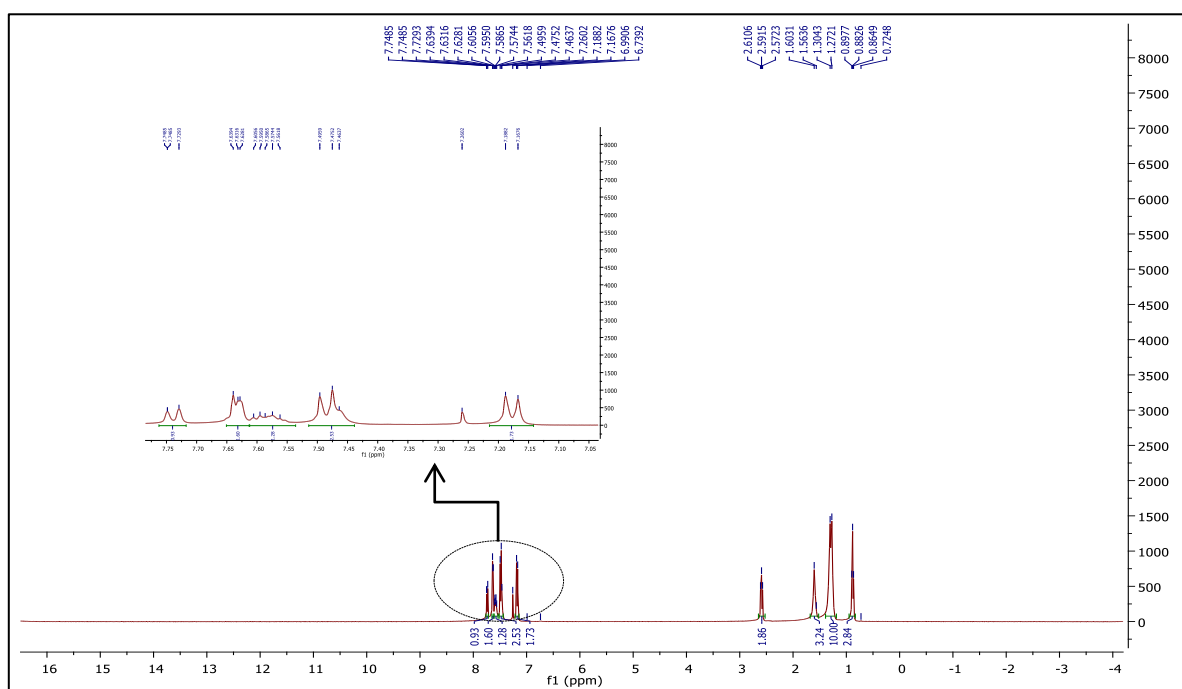
Anexo 89- Espetro HMBC do composto 4.e, em DMSO- d_6 .



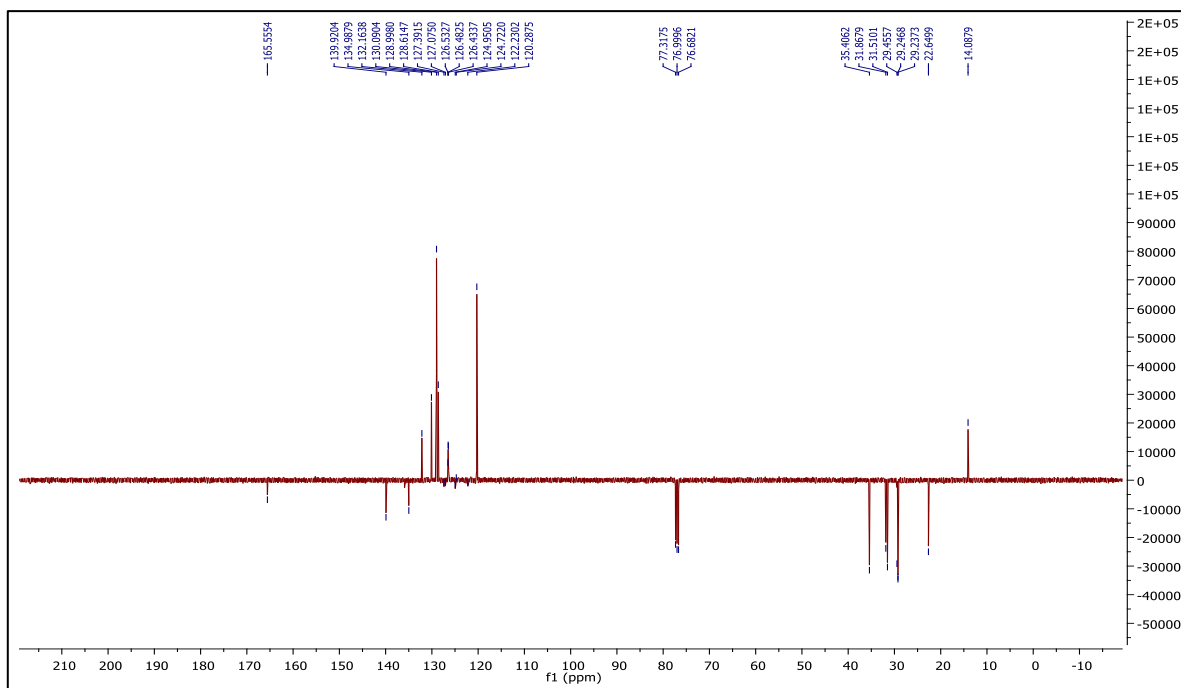
Anexo 90- Espectro de IV do composto 4.e.



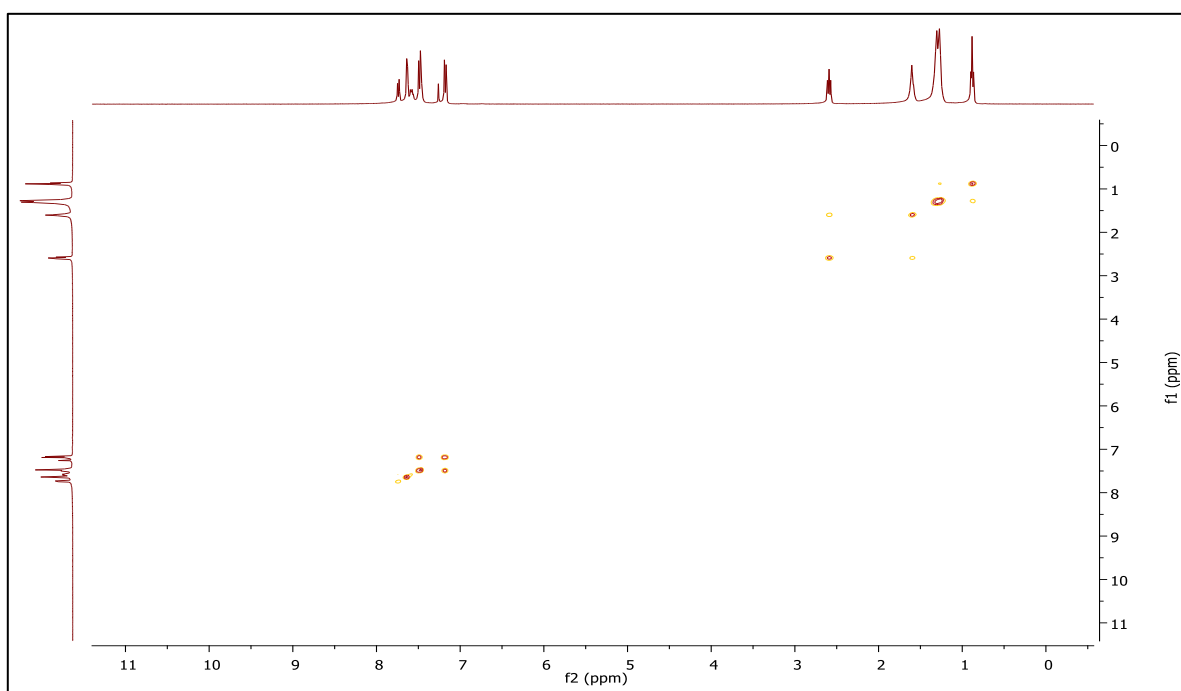
Anexo 91- Espectro de HRMS do composto 4.e.



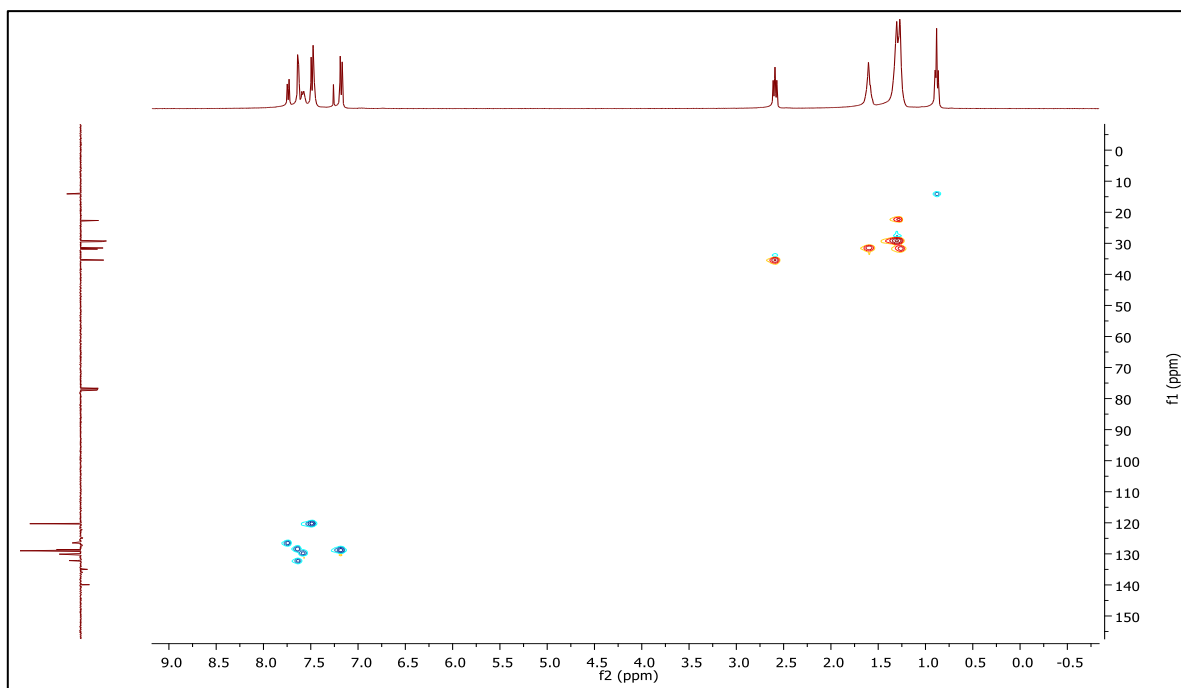
Anexo 92- Espectro de RMN ¹H do composto 3.f, em CDCl₃.



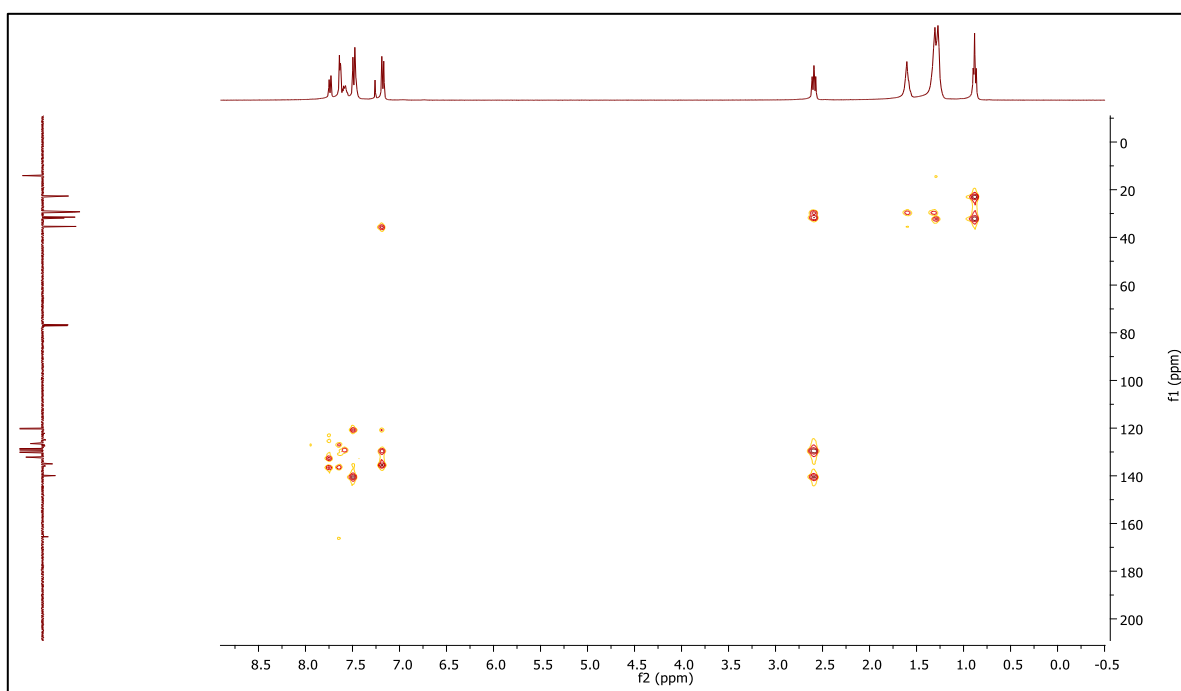
Anexo 93- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.f, em CDCl_3 .



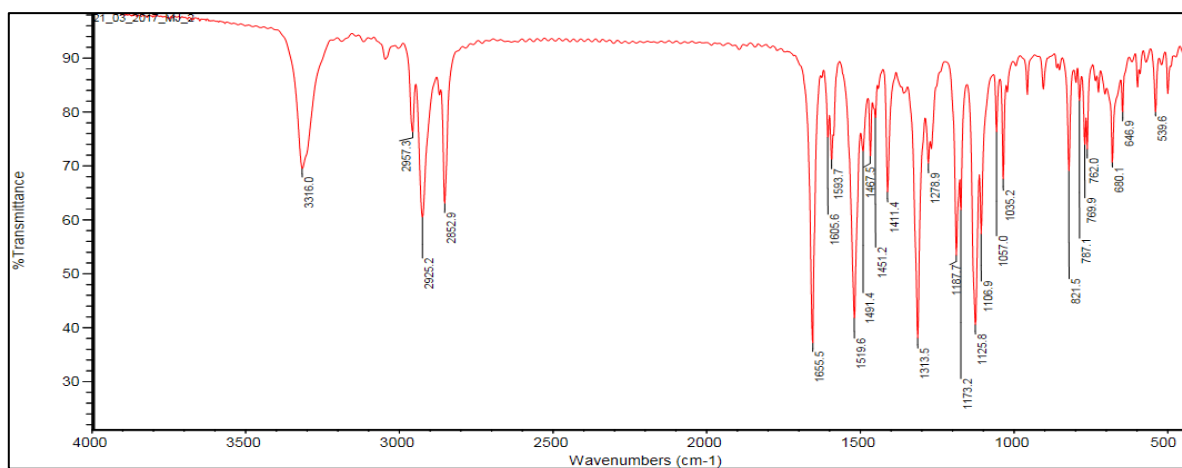
Anexo 94- Espectro COSY do composto 3.f, em CDCl_3 .



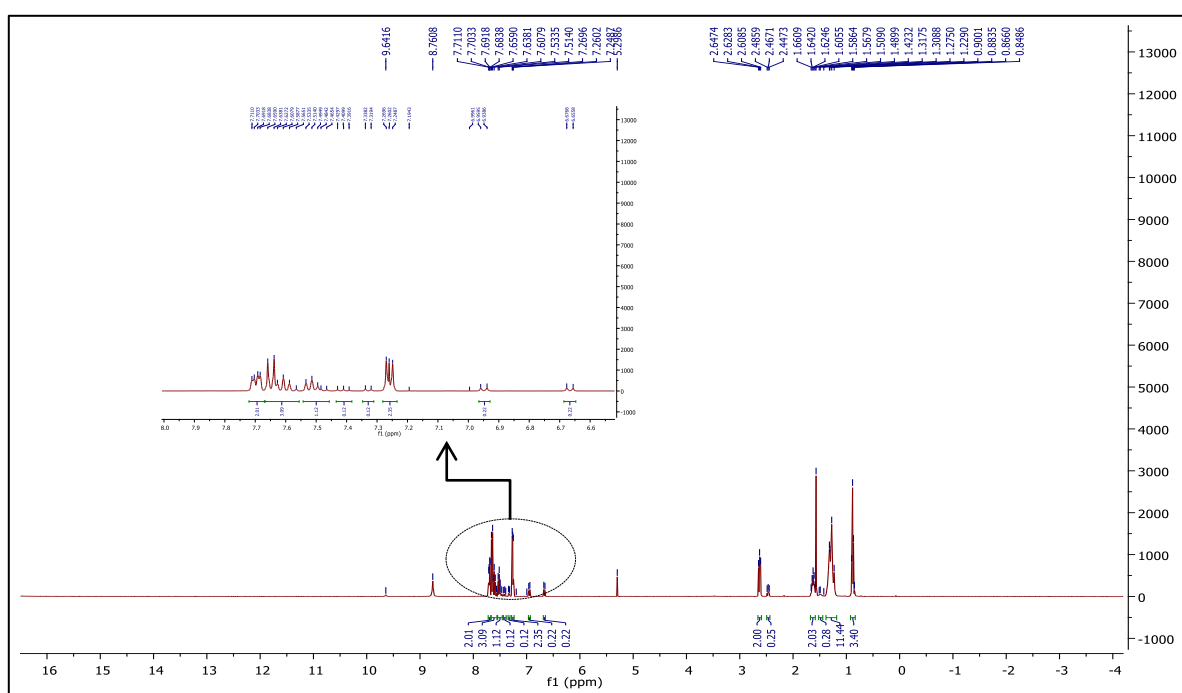
Anexo 95- Espetro HSQC do composto 3.f, em CDCl₃.



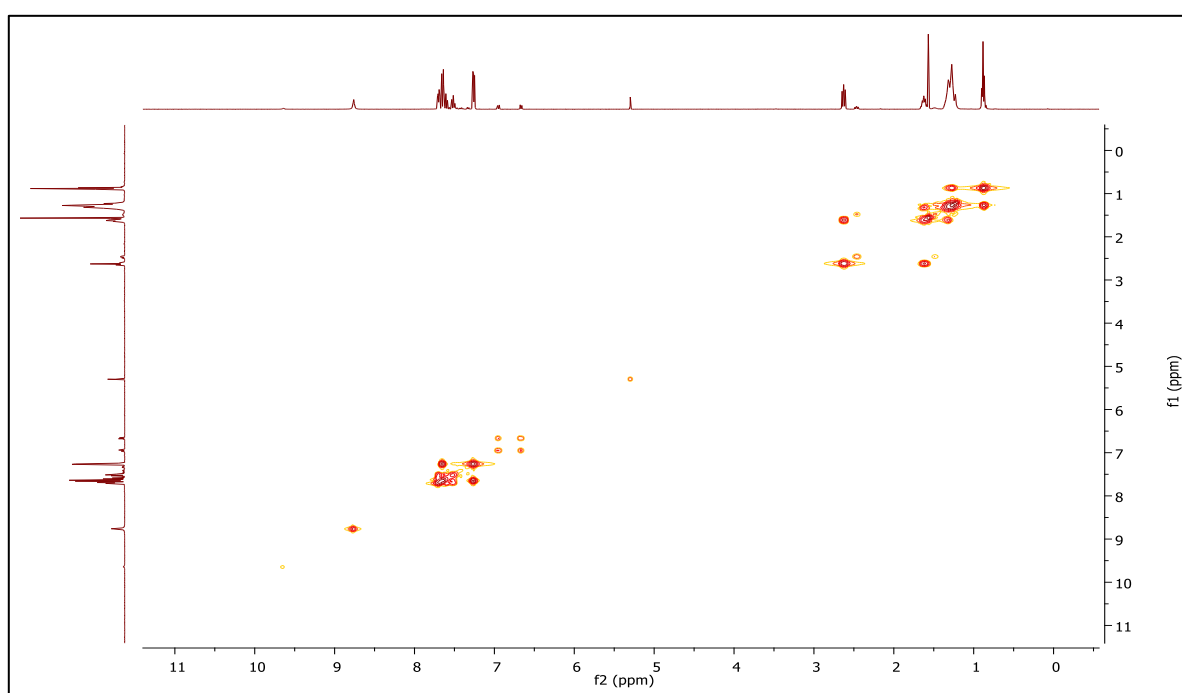
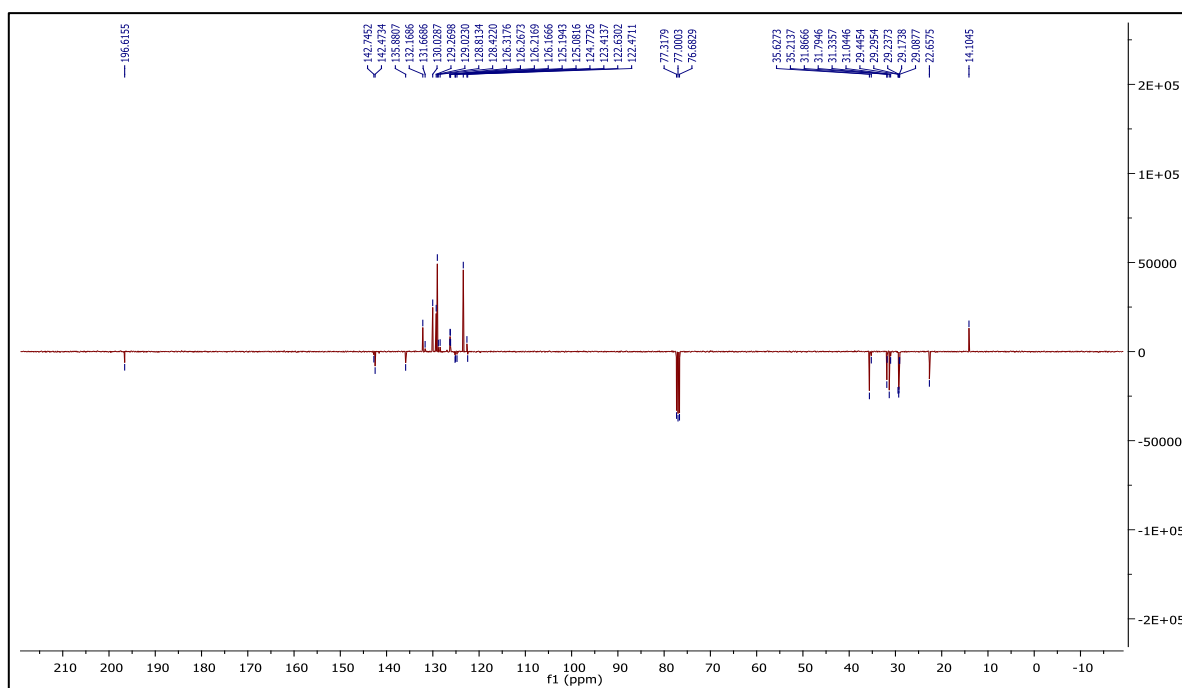
Anexo 96- Espetro HMBC do composto 3.f, em CDCl₃.

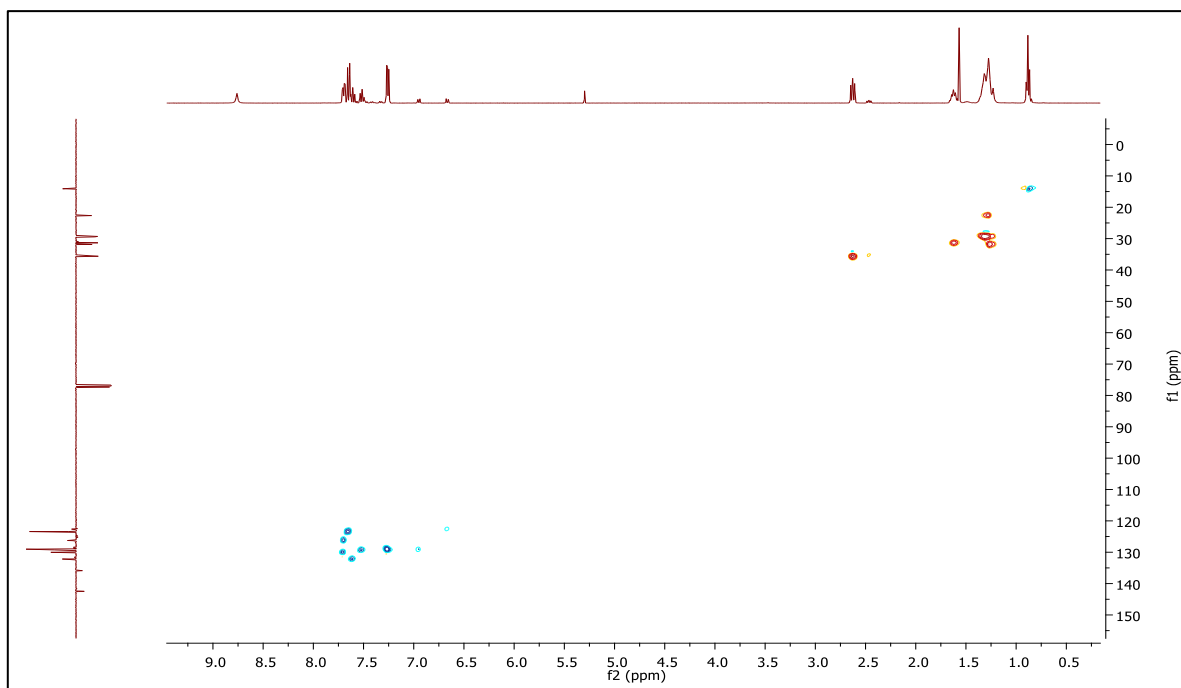


Anexo 97- Espectro de IV do composto 3.f.

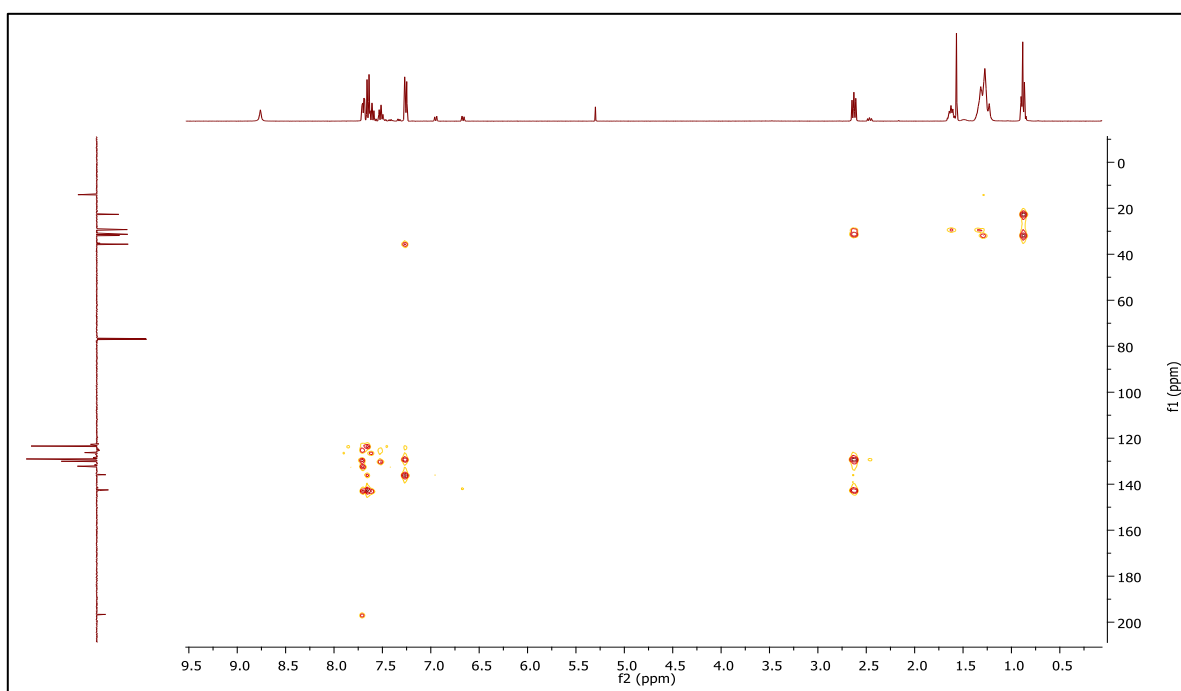


Anexo 98- Espectro de RMN ¹H do composto 4.f, em CDCl₃.

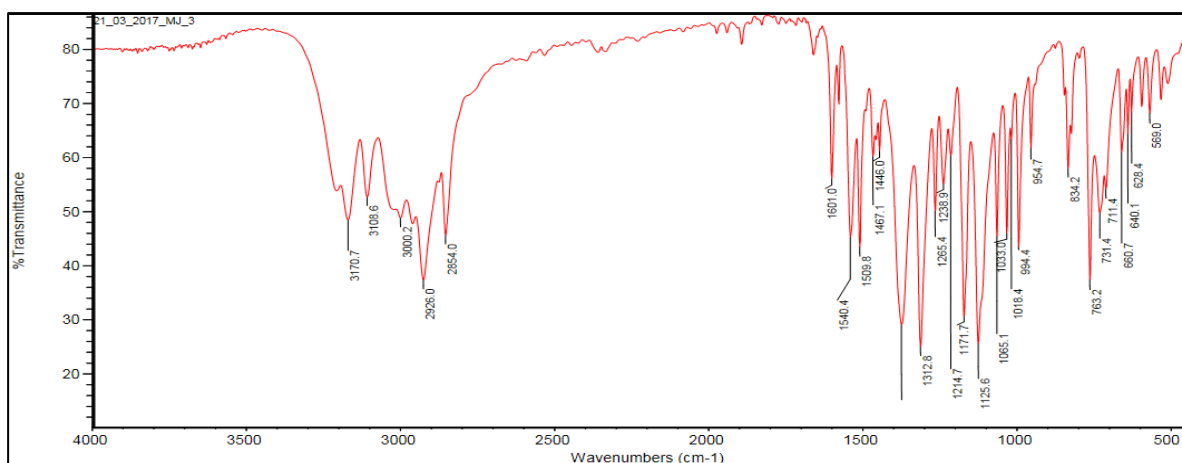




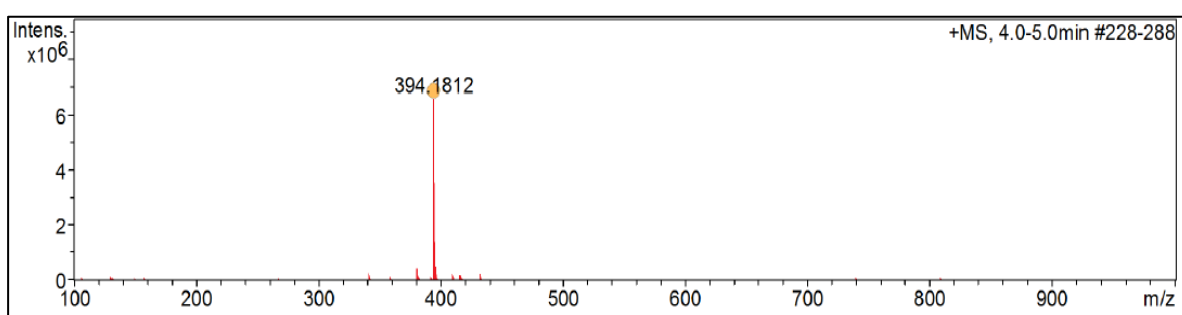
Anexo 101- Espectro HSQC do composto 4.f, em CDCl_3 .



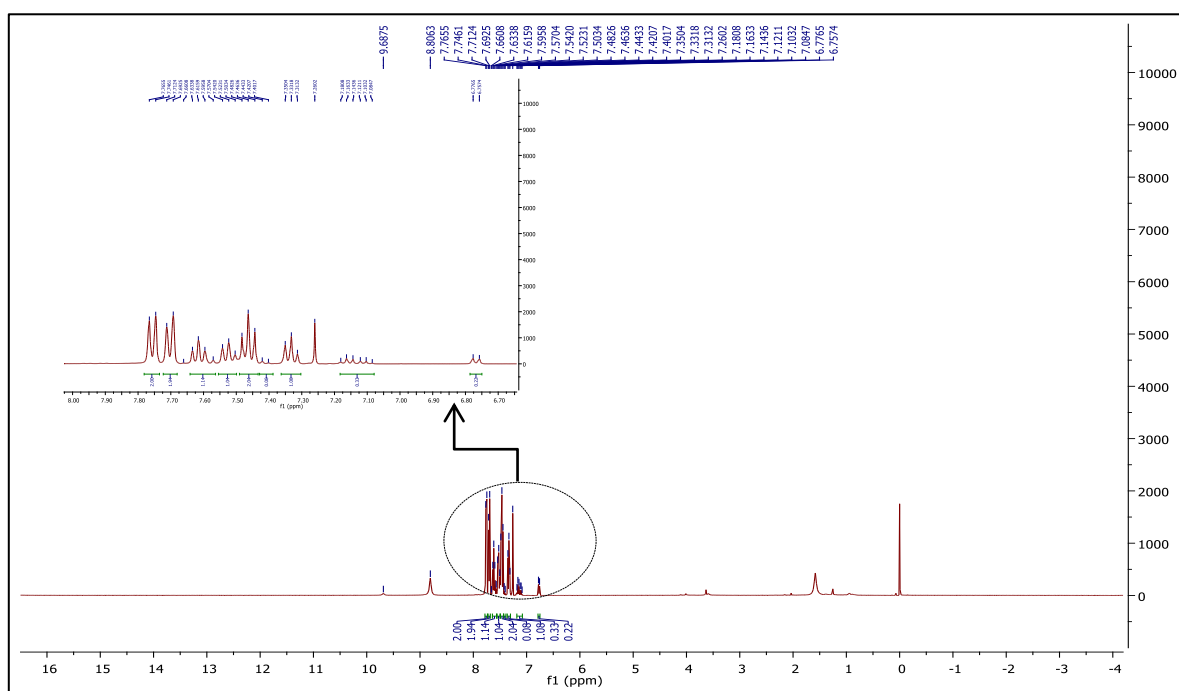
Anexo 102- Espectro HMBC do composto 4.f, em CDCl_3 .



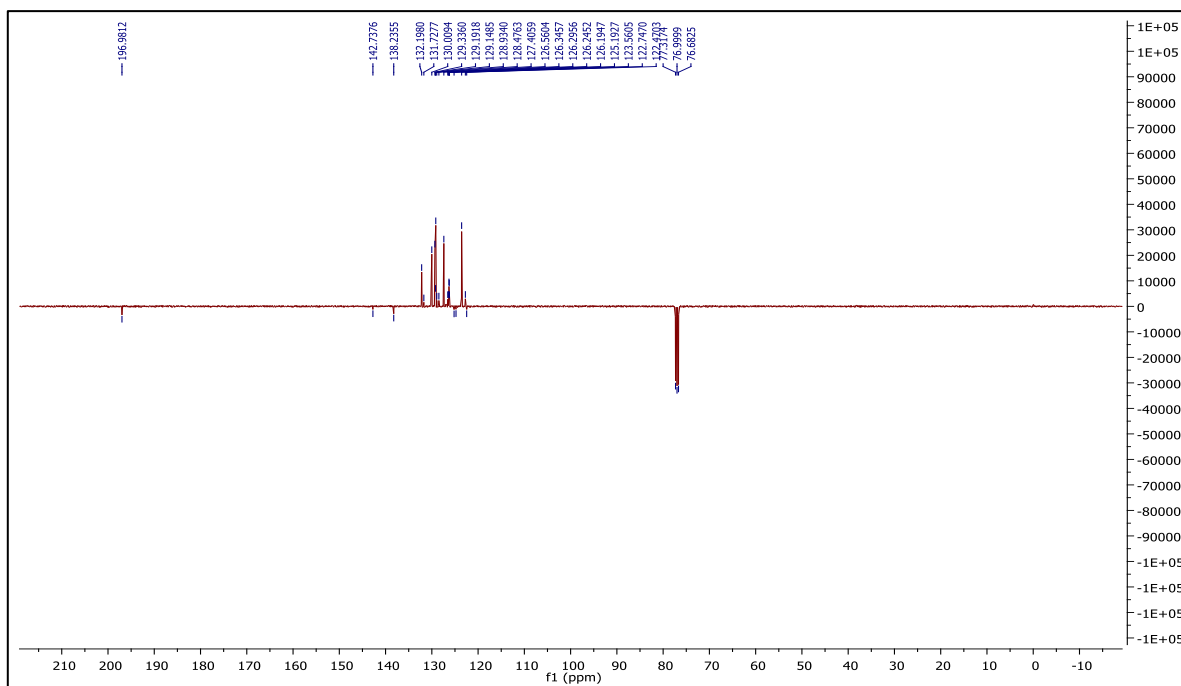
Anexo 103- Espectro de IV do composto 4.f.



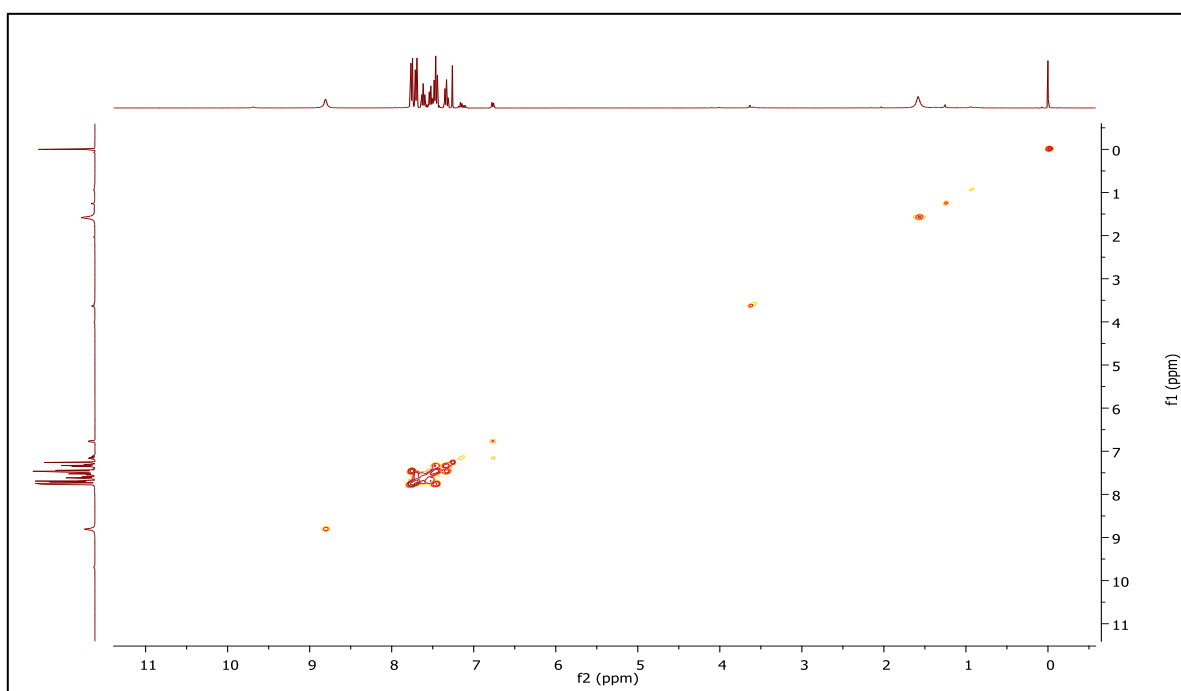
Anexo 104- Espectro de HRMS do composto 4.f.



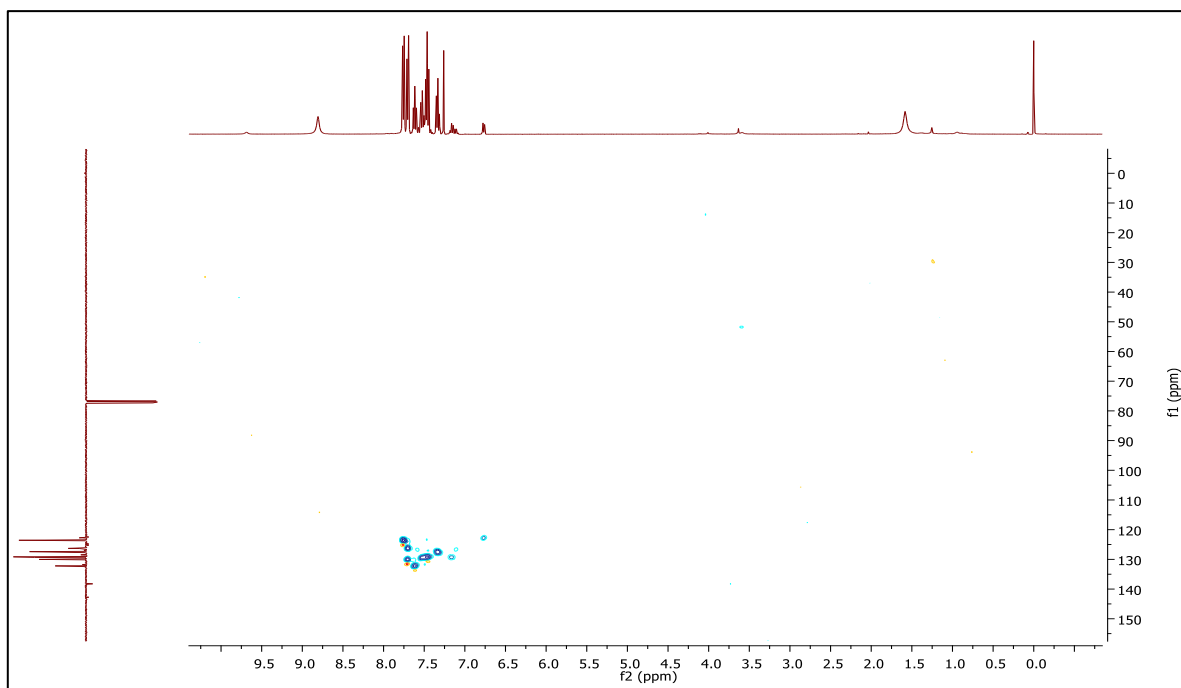
Anexo 105- Espectro de RMN ^1H do composto 4.h, em CDCl_3 .



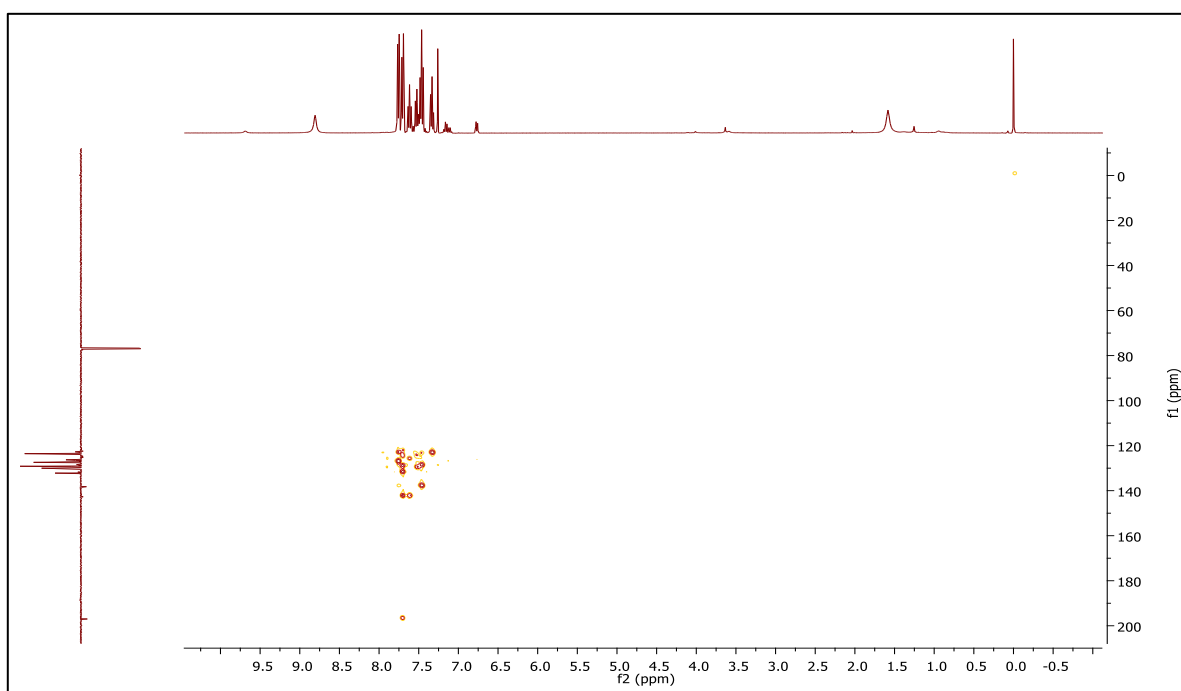
Anexo 106- Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.h, em CDCl_3 .



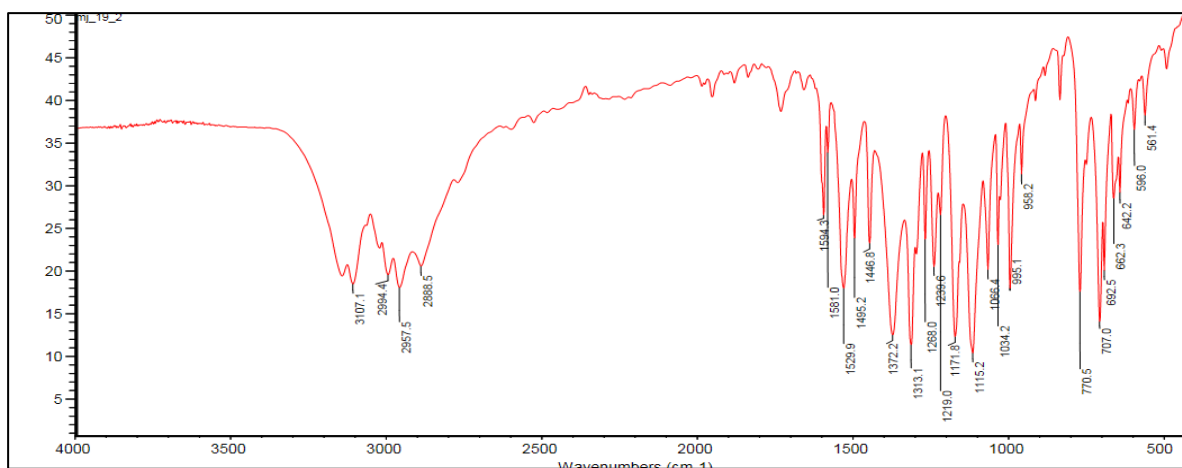
Anexo 107- Espetro COSY do composto 4.h, em CDCl_3 .



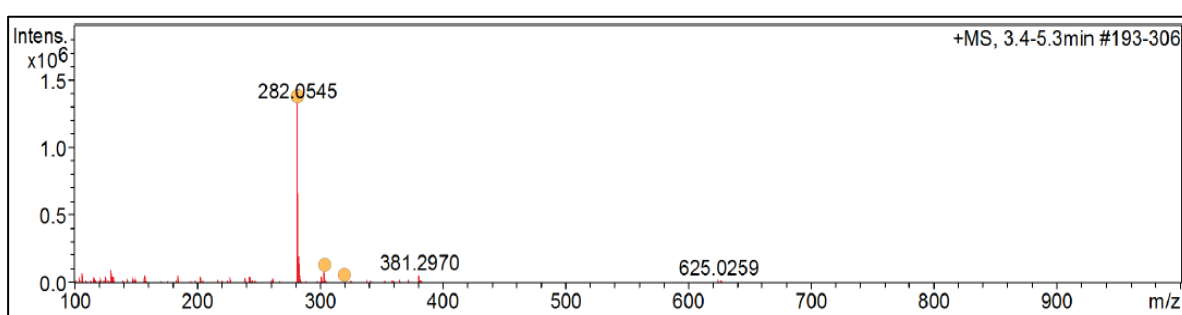
Anexo 108- Espetro HSQC do composto 4.h, em CDCl_3 .



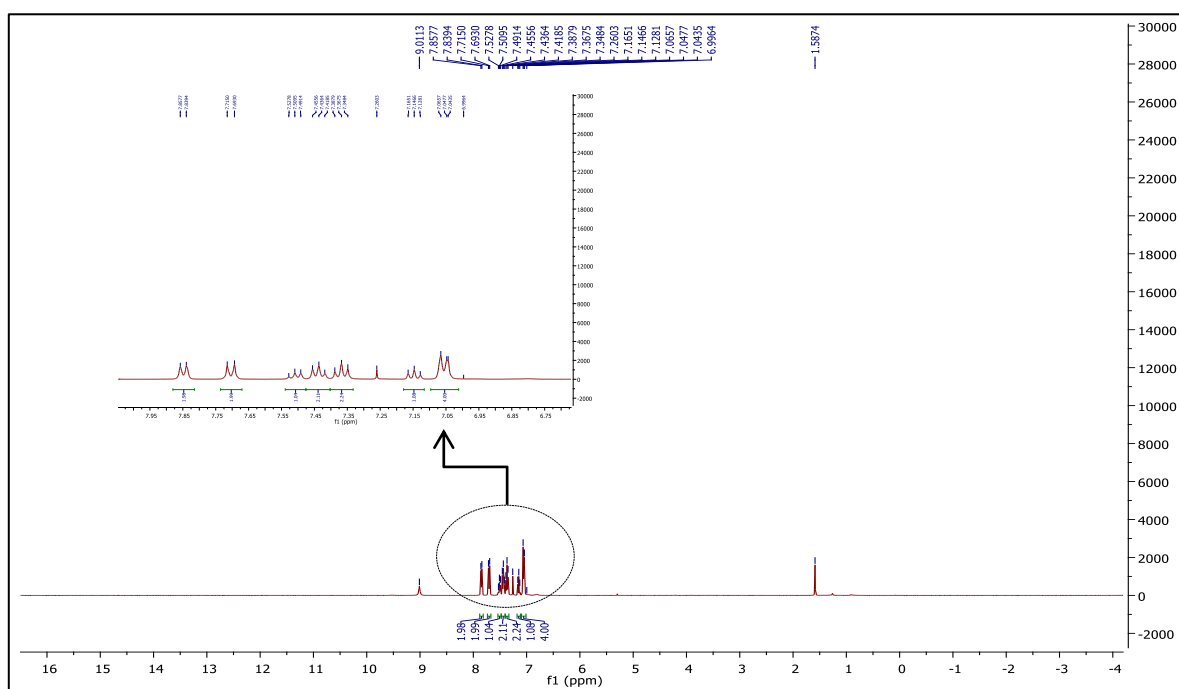
Anexo 109- Espetro HMBC do composto 4.h, em CDCl_3 .



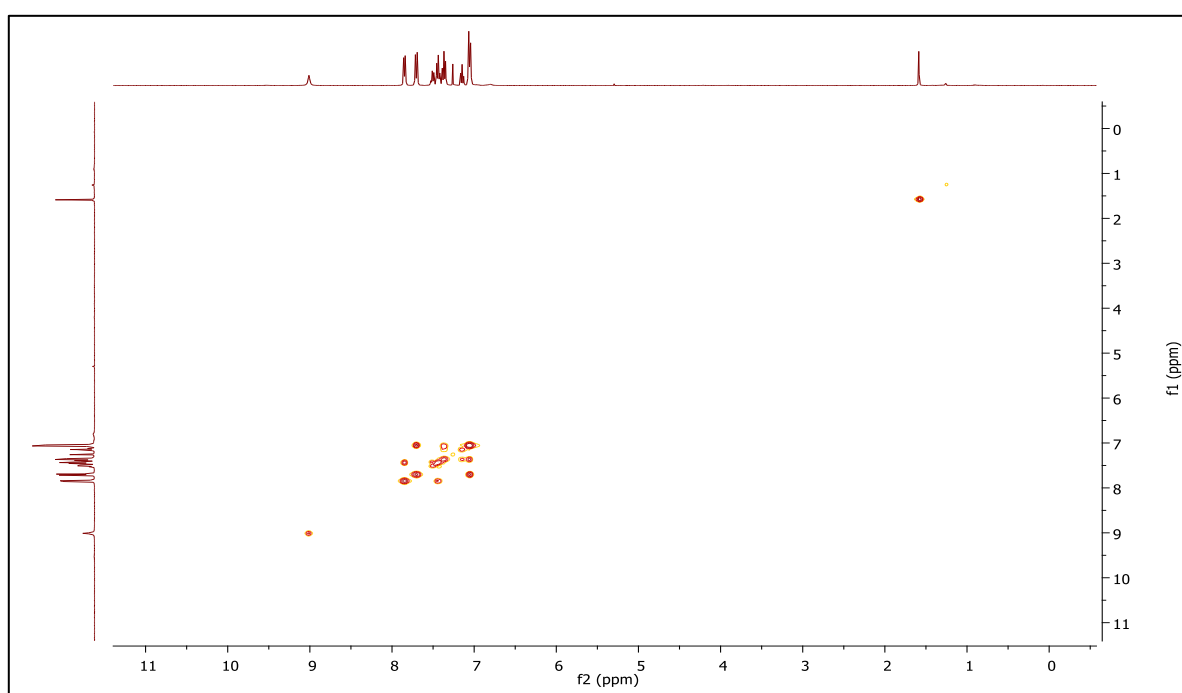
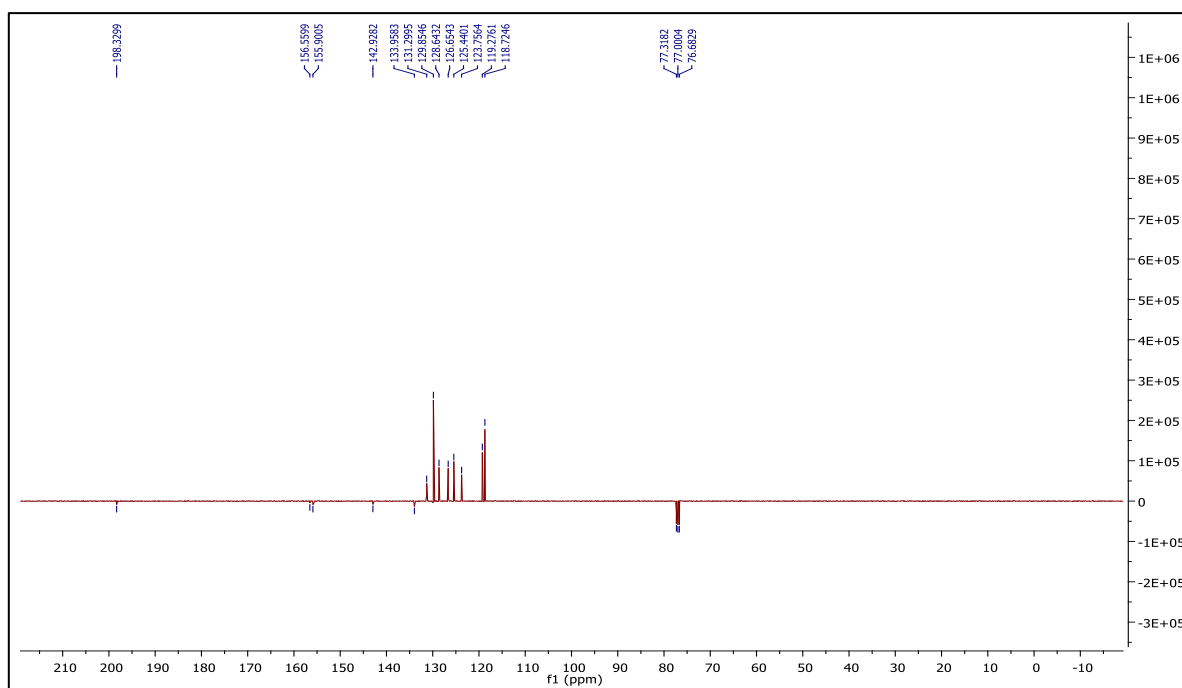
Anexo 110- Espectro de IV do composto 4.h.

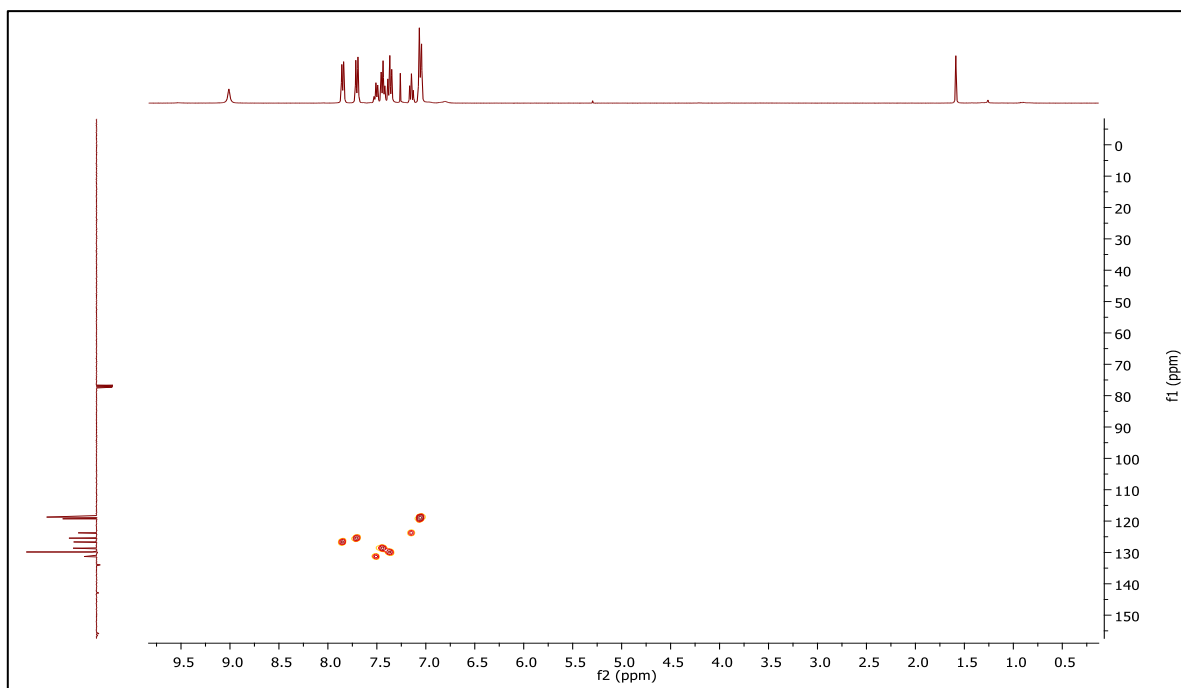


Anexo 111- Espectro de HRMS do composto 4.h.

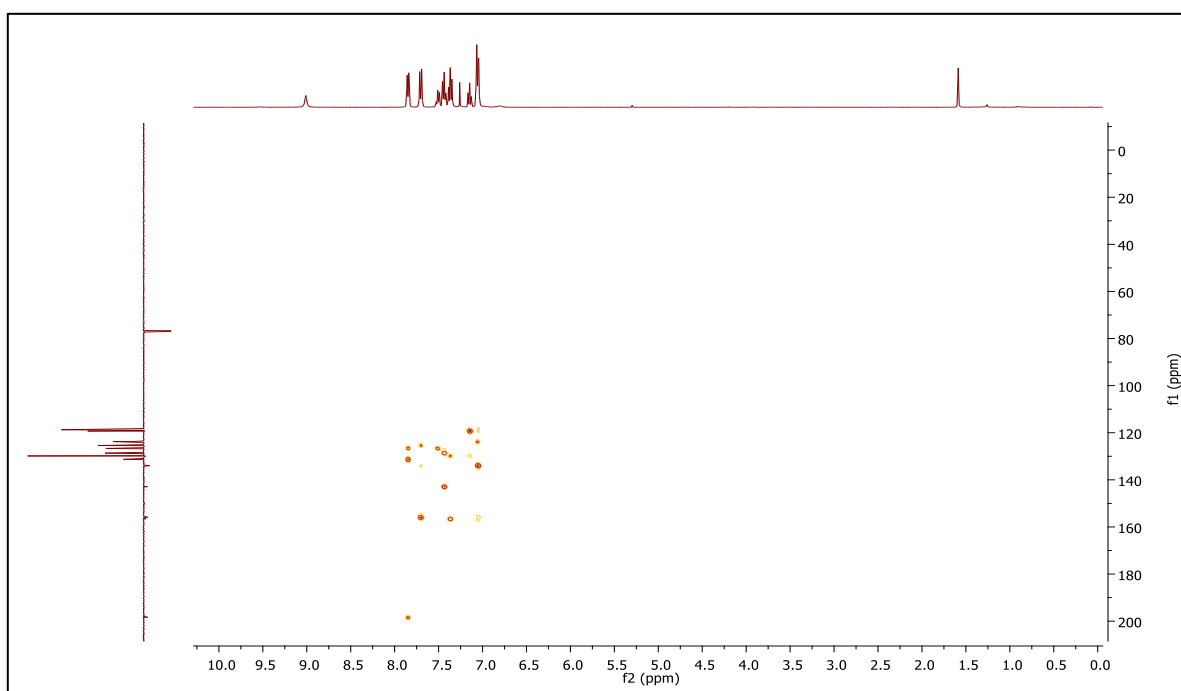


Anexo 112- Espectro de RMN ¹H do composto 4.j, em CDCl₃.

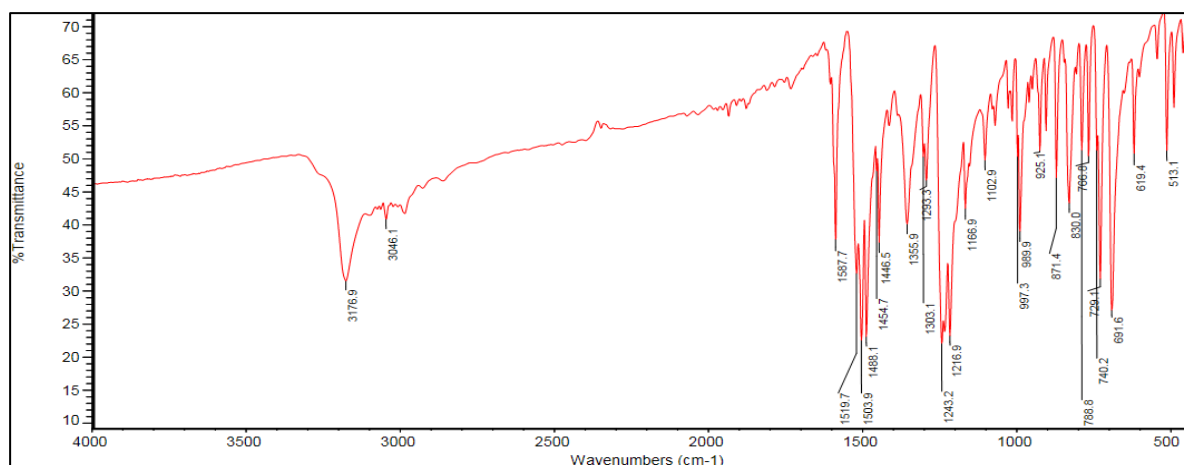




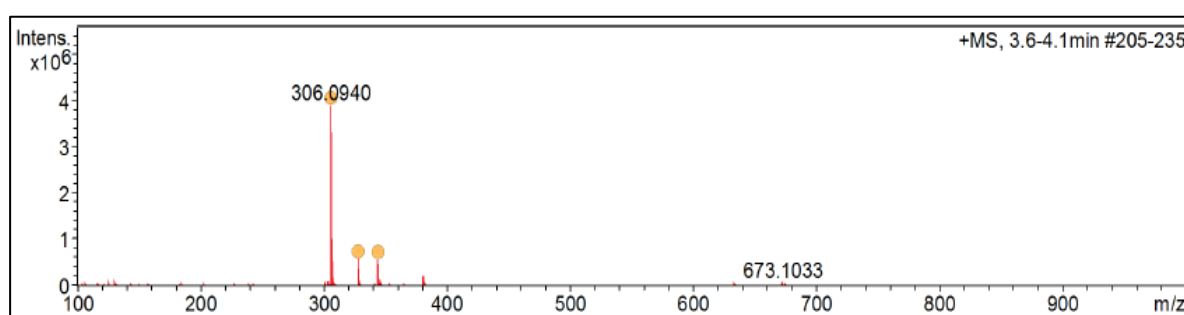
Anexo 115- Espetro HSQC do composto 4.j, em CDCl₃.



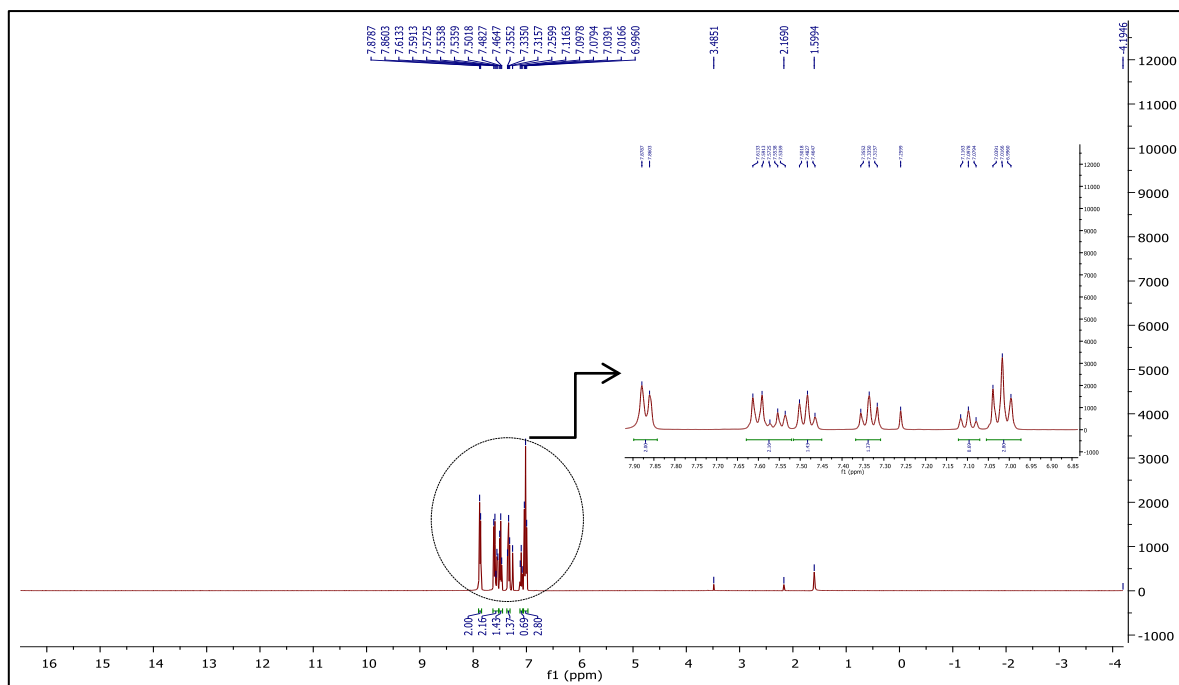
Anexo 116- Espetro HMBC do composto 4.j, em CDCl₃.



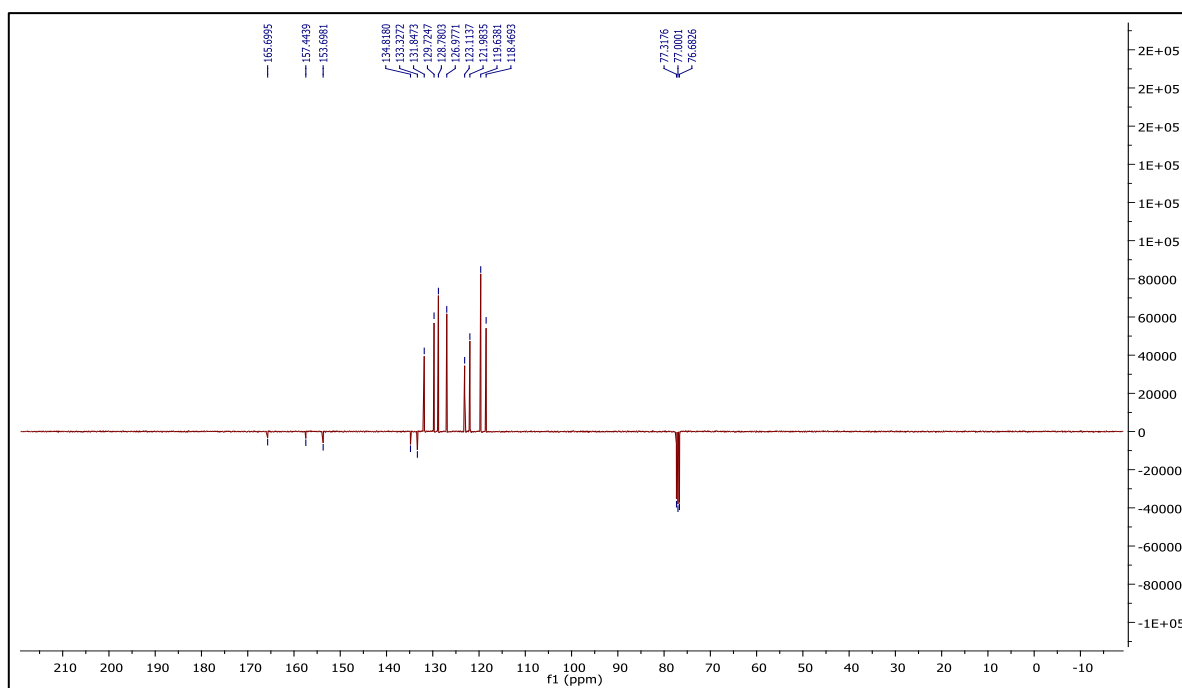
Anexo 117- Espectro de IV do composto 4.j.



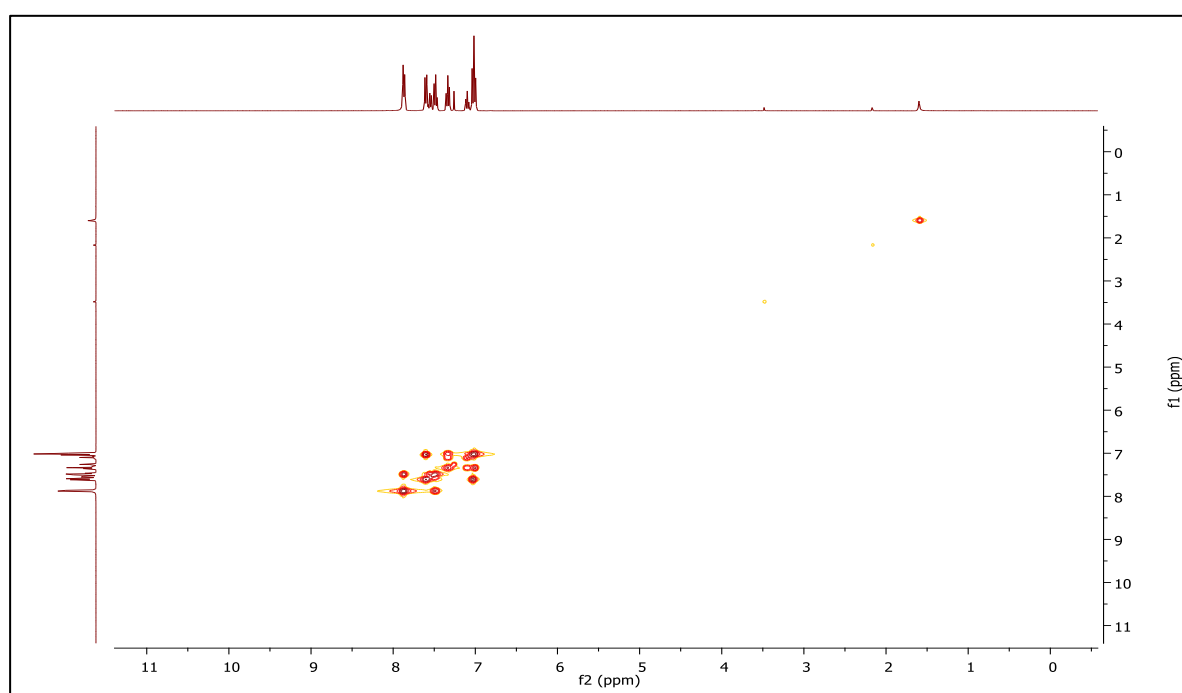
Anexo 118- Espectro de HRMS do composto 4.j.



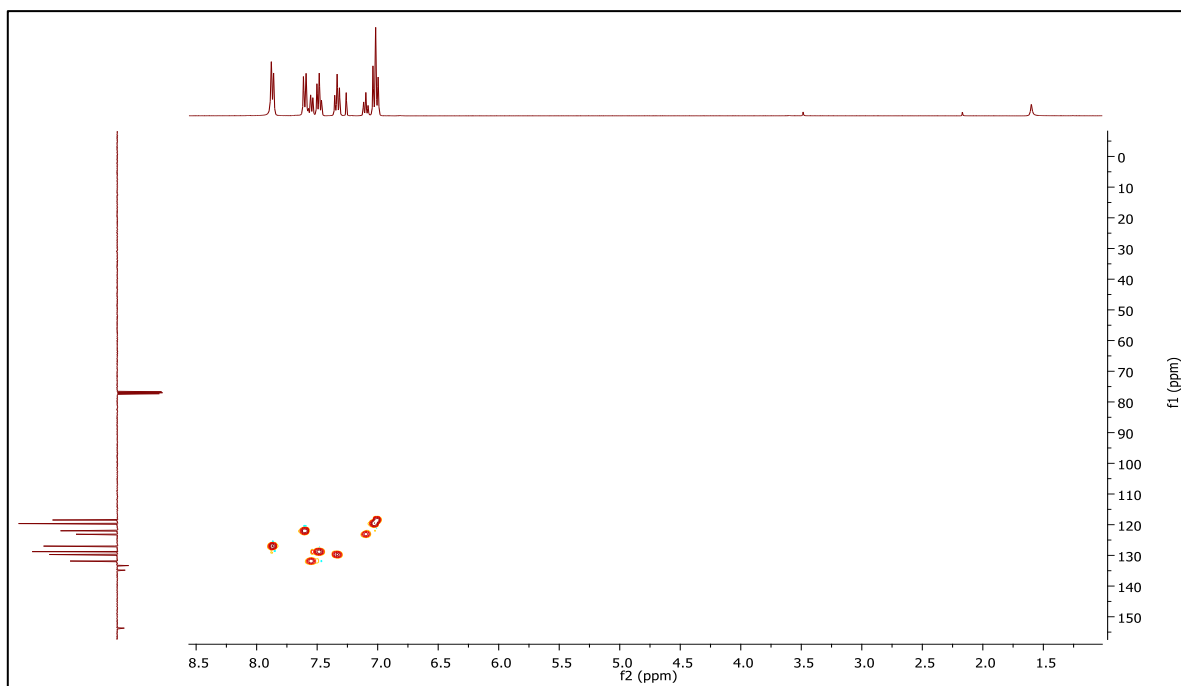
Anexo 119- Espectro de RMN ¹H do composto 3.l, em CDCl₃.



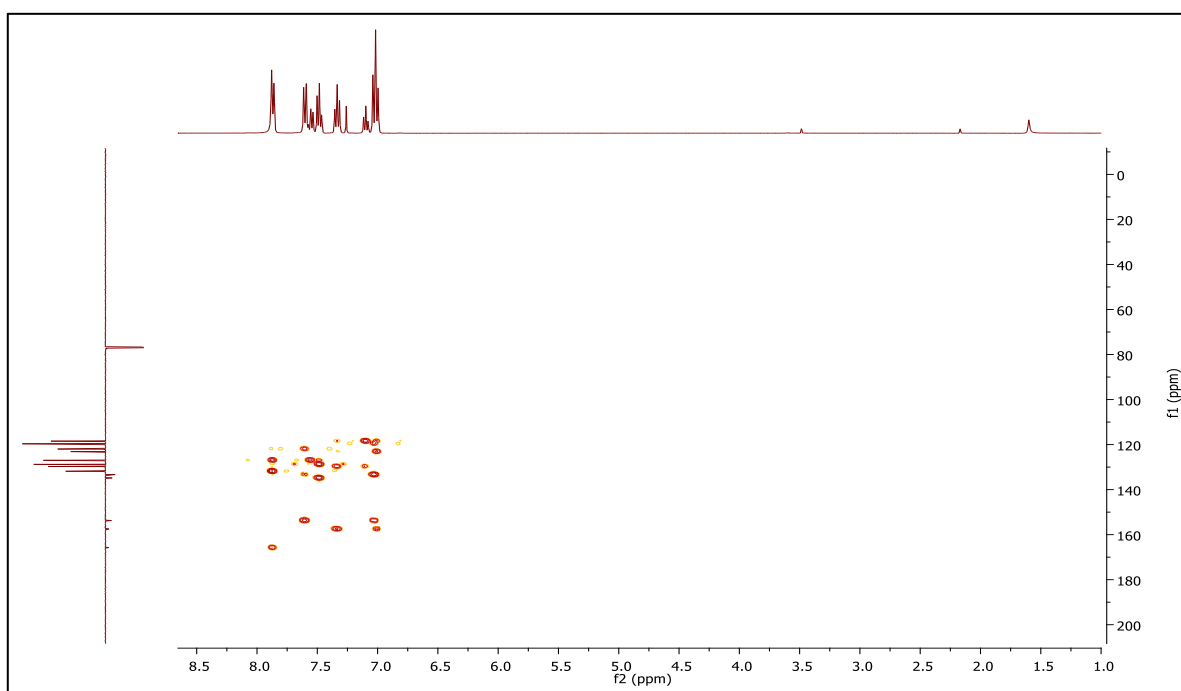
Anexo 120- Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.I, em CDCl_3 .



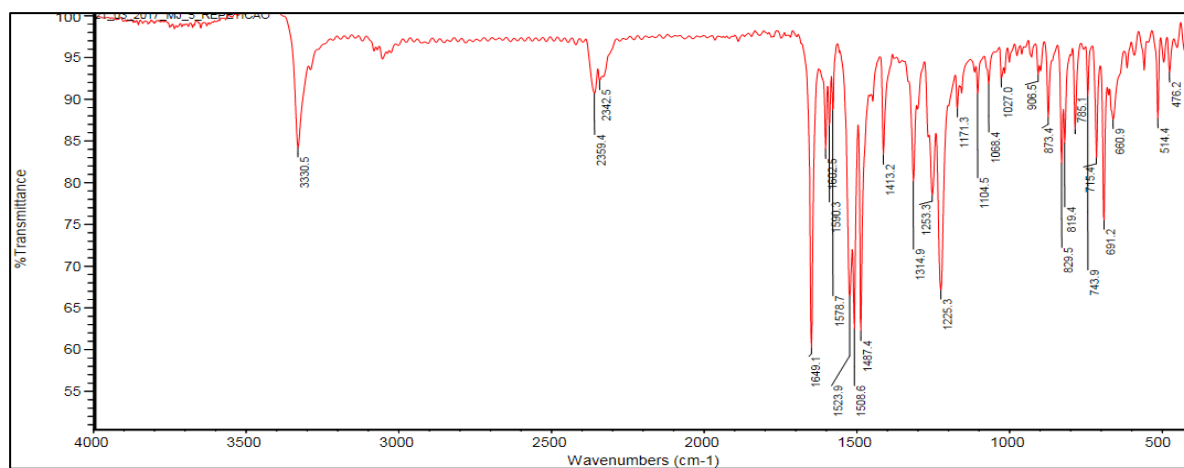
Anexo 121- Espectro COSY do composto 3.I, em CDCl_3 .



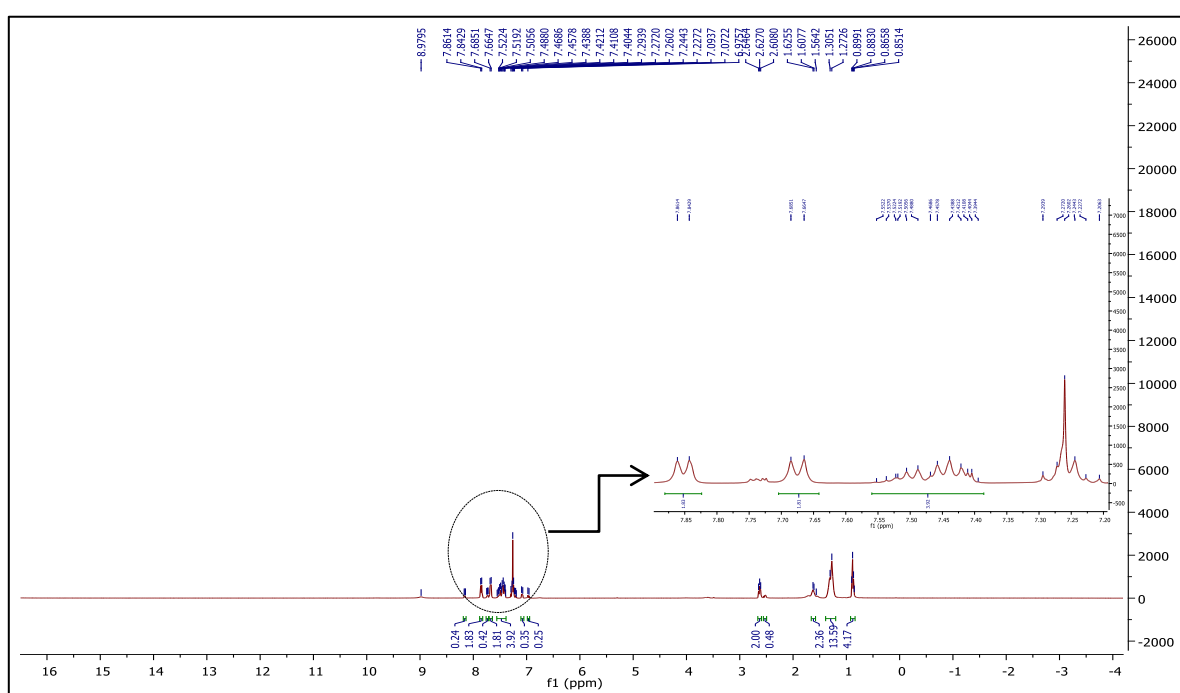
Anexo 122- Espectro HSQC do composto 3.I, em CDCl₃.



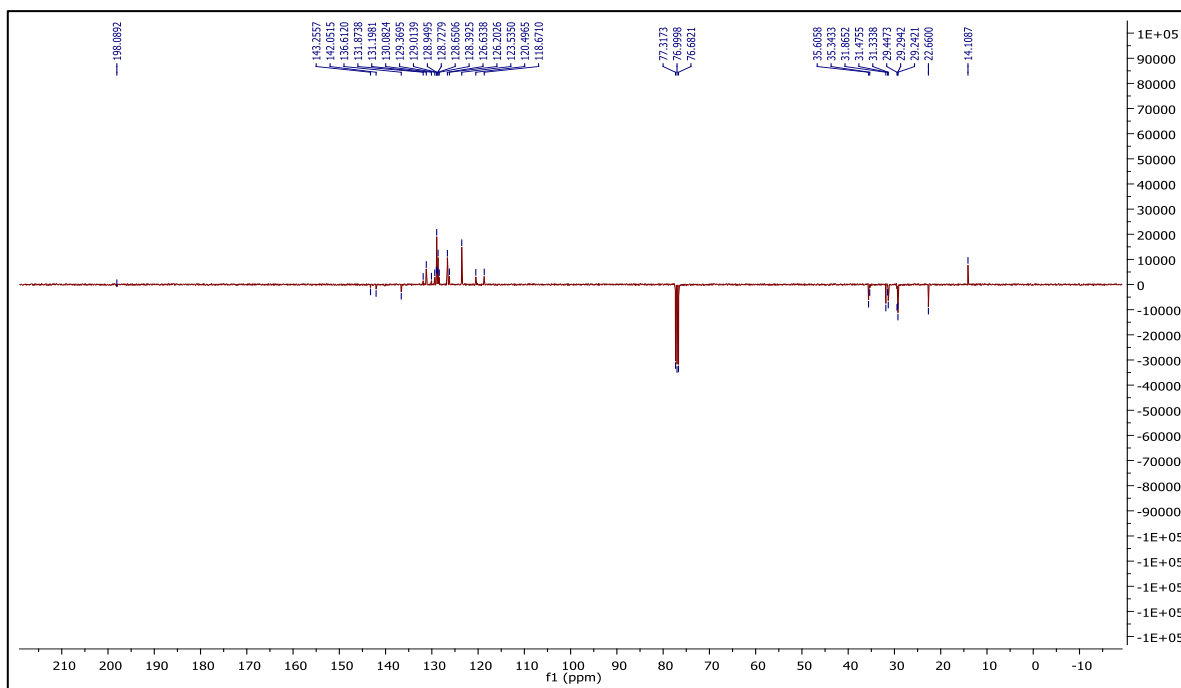
Anexo 123- Espectro HMBC do composto 3.I, em CDCl₃.



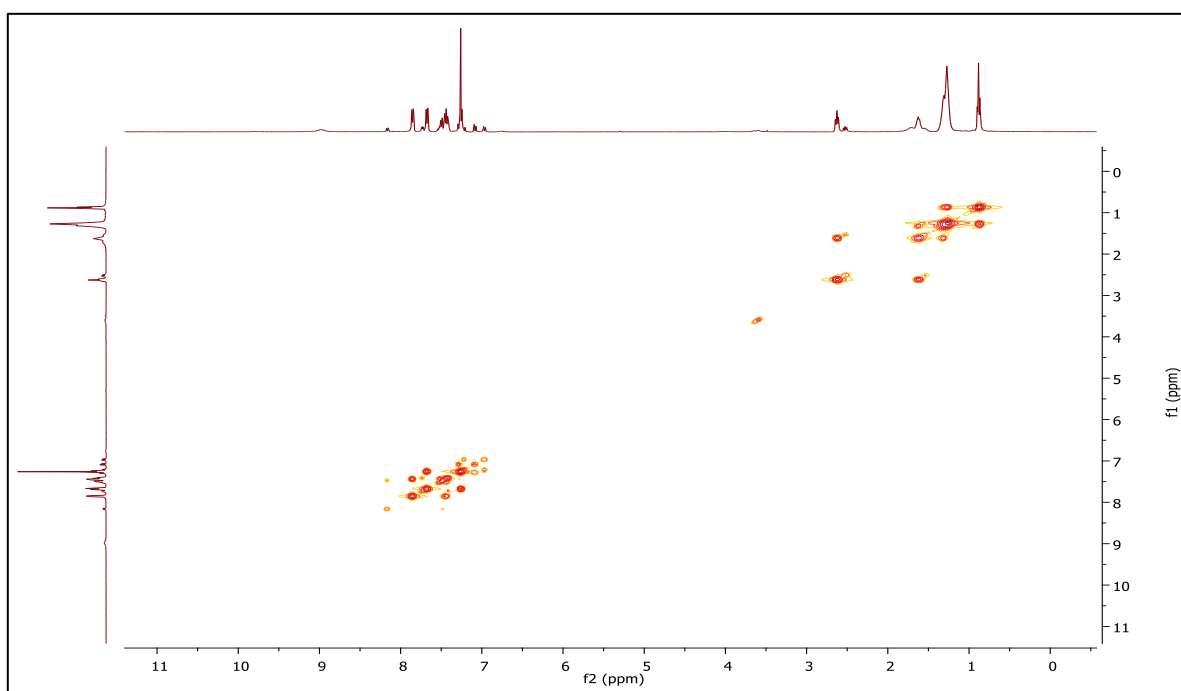
Anexo 124- Espectro de IV do composto 3.I.



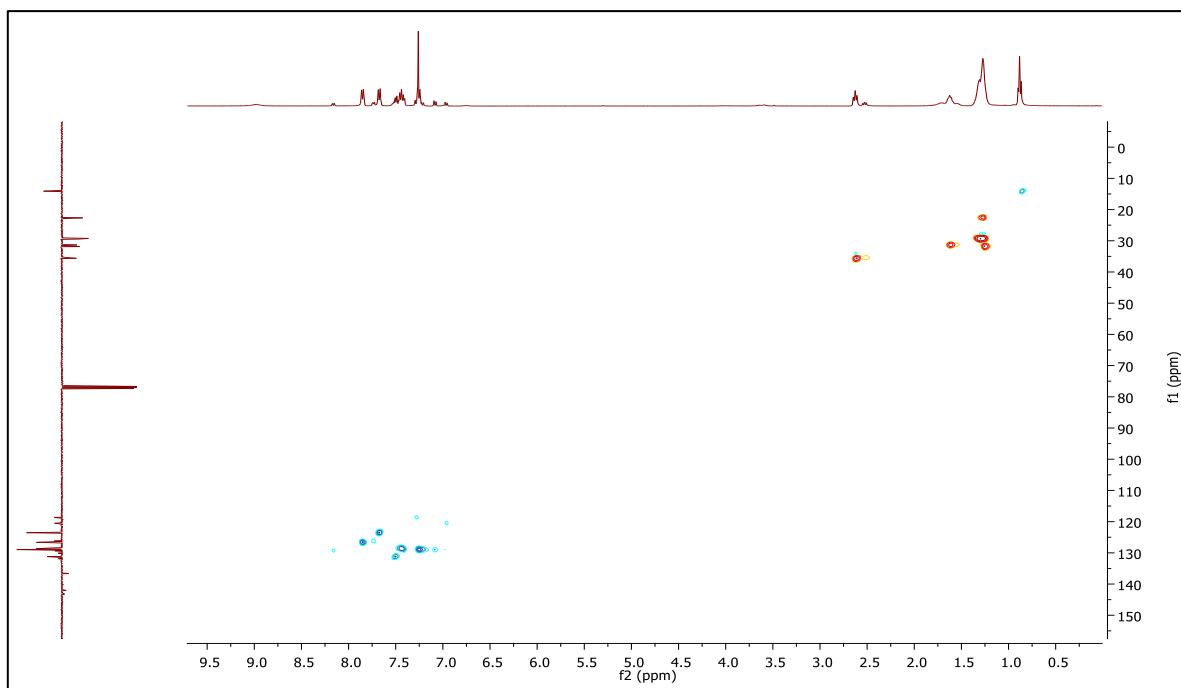
Anexo 125- Espectro de RMN ¹H do composto 4.I, em CDCl₃.



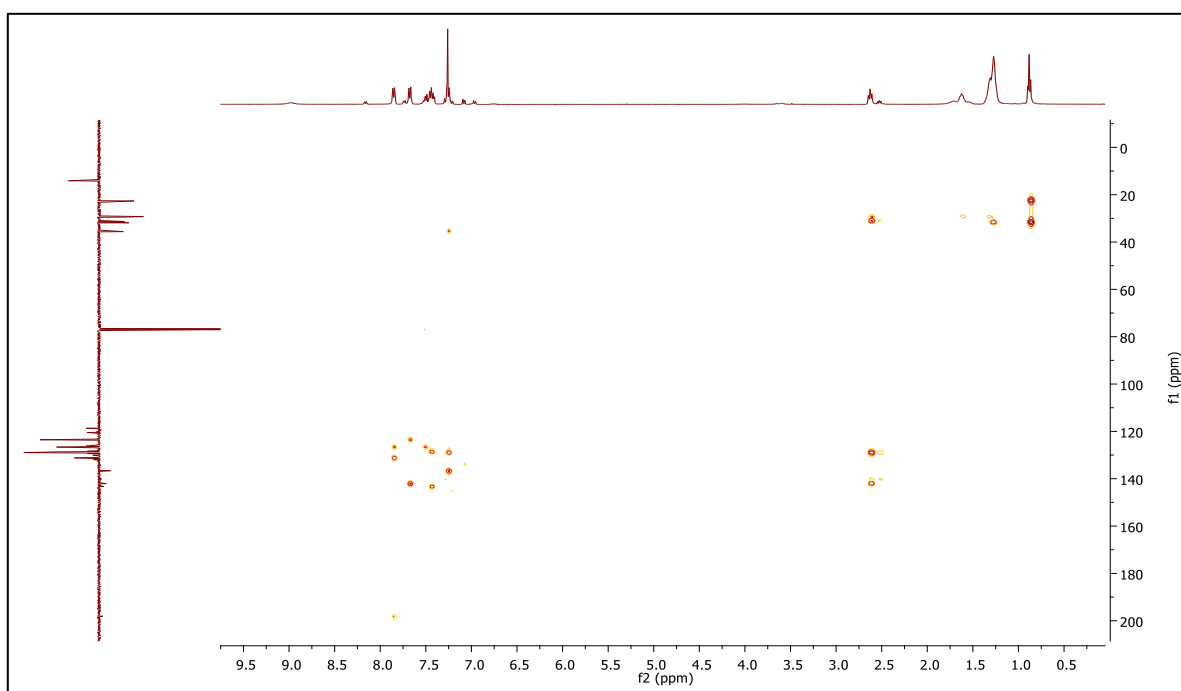
Anexo 126 - Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.I, em CDCl_3 .



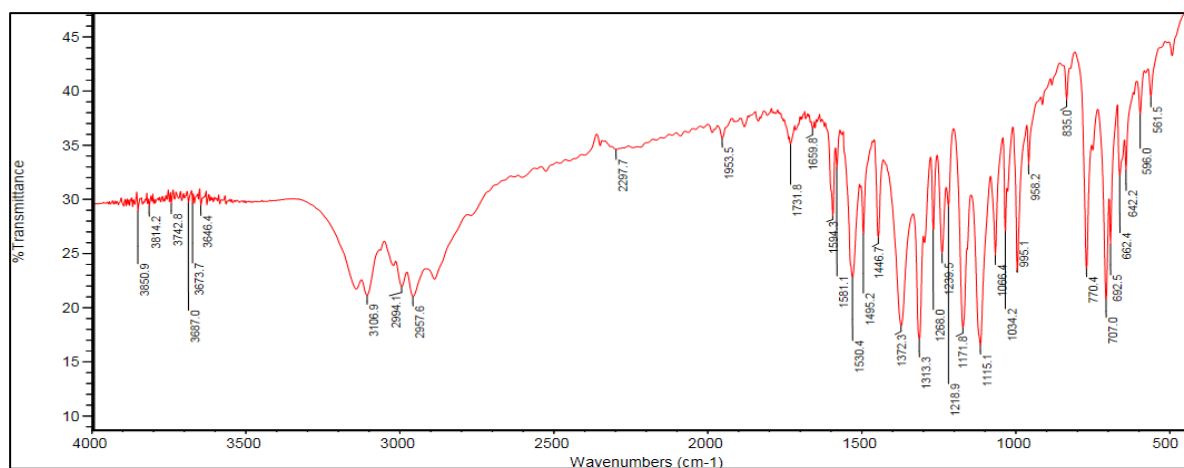
Anexo 127- Espetro COSY do composto 4.I, em CDCl_3 .



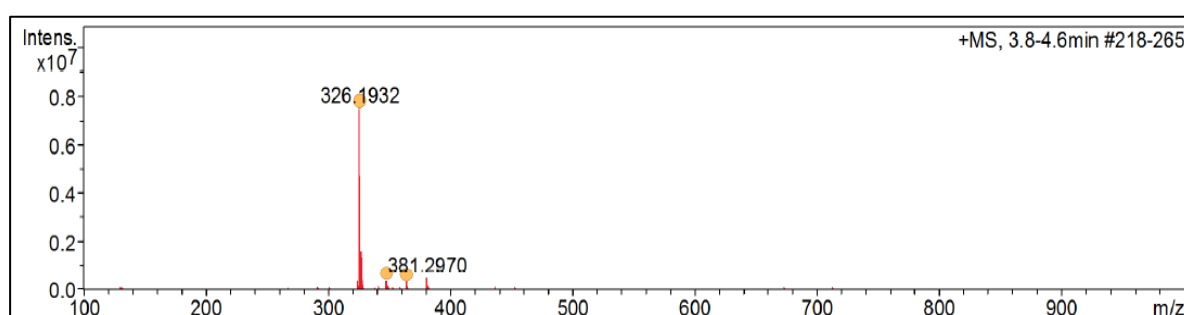
Anexo 128- Espetro HSQC do composto 4.I, em CDCl_3 .



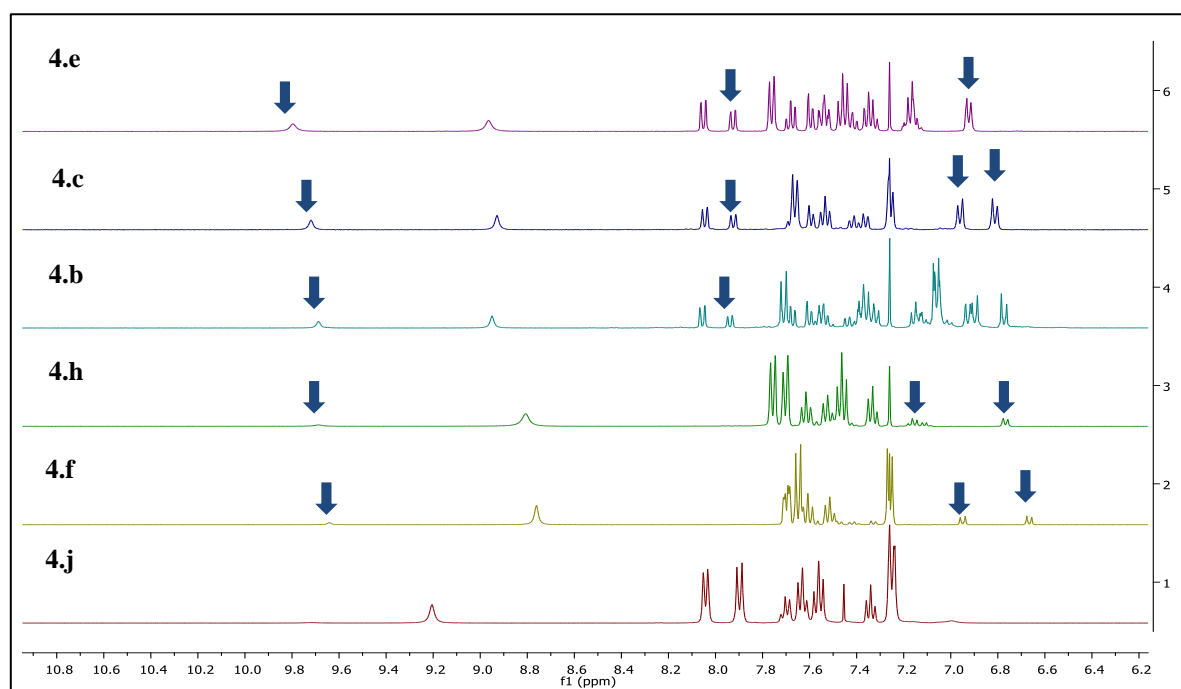
Anexo 129- Espetro HMBC do composto 4.I, em CDCl_3 .



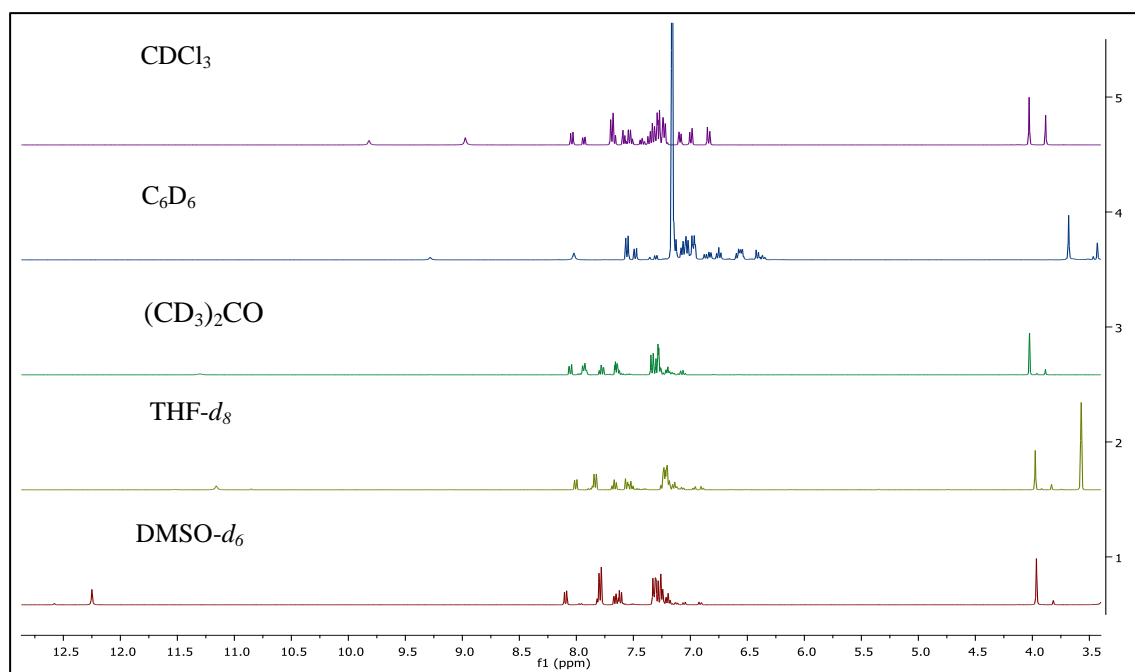
Anexo 130- Espectro de IV do composto 4.l.



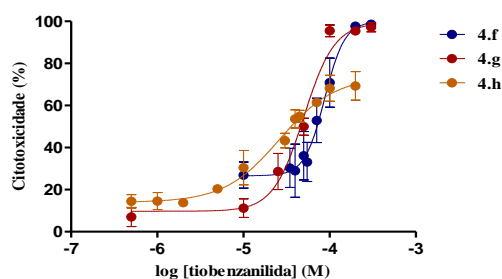
Anexo 131- Espectro de HRMS do composto 4.l.



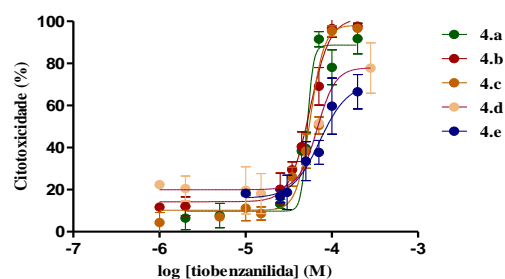
Anexo 132- Sobreposição das ampliações na zona aromática dos espectros de ^1H RMN dos compostos 4.b, 4.c, 4.e, 4.h, 4.f e 4.j. As setas a azul indicam alguns sinais dos rotâmeros *cis* nos respectivos espectros.



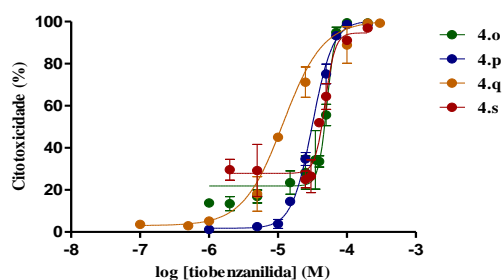
Anexo 133- Sobreposição das ampliações dos espectros em vários solventes do composto 4.a.



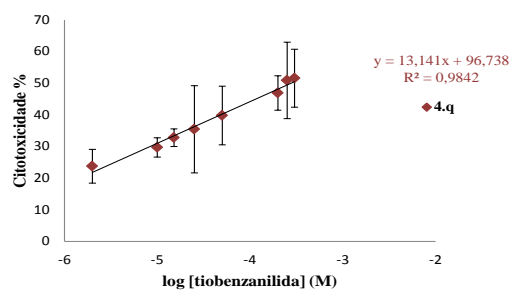
Anexo 134- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.f-4.g da linha celular A375.



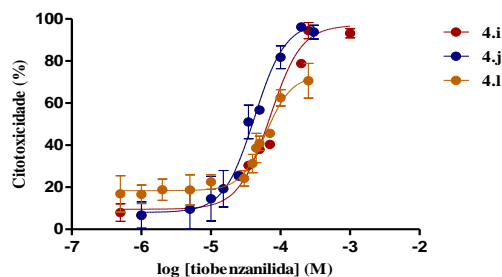
Anexo 135- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.a-4.e da linha celular A375.



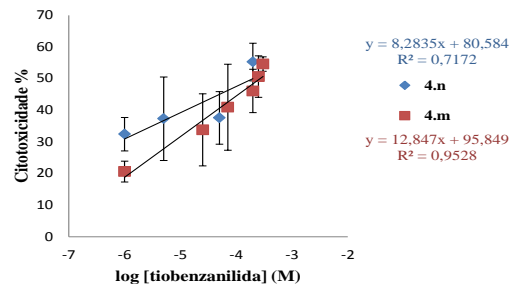
Anexo 136- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.o-4.s da linha celular A375.



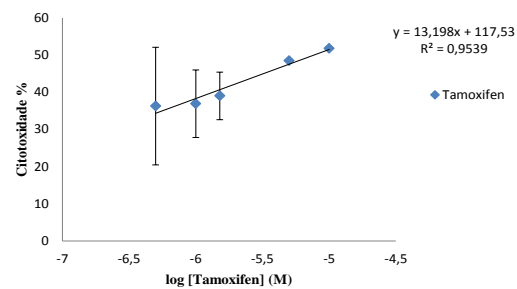
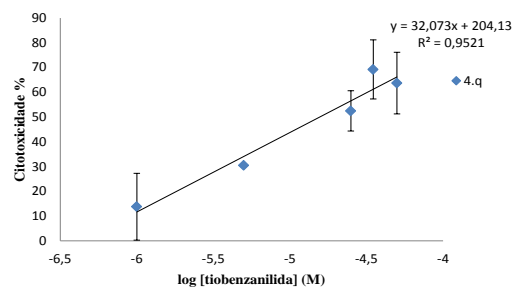
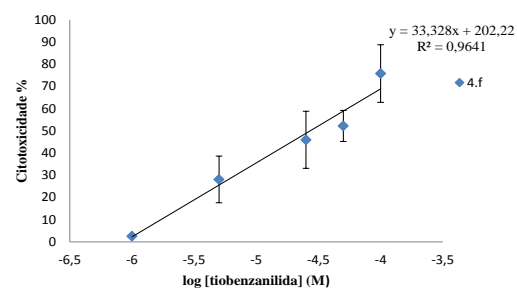
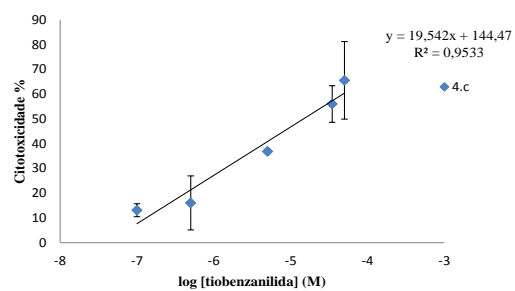
Anexo 137- Parte linear da curva dose-resposta do composto 4.q da linha celular A375.



Anexo 138- Sobreposição das curvas dose-resposta dos compostos 4.i-4.l da linha celular A375.



Anexo 139- Parte linear das curvas dose-resposta dos compostos 4.m-4.n da linha celular A375.



Anexo 140- Parte linear das curvas dose-resposta dos compostos 4.c, 4.f, 4.q e do tamoxifen da linha celular MCF7.